

Crf2 – Ein neues Antigen von *Aspergillus fumigatus*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Mark Schütte
aus Westerstede

1. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Dr. Wilfried Bautsch
eingereicht am:	06.05.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	27.08.2009
Druckjahr 2009	

per aspera ad astra

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis.....	XI
2 Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Die Schimmelpilzgattung <i>Aspergillus</i>	5
3.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
3.3 Mykosen.....	7
3.4 Aspergillosen.....	8
3.5 Diagnostik der Invasiven Aspergillose.....	12
3.6 Therapie der Invasiven Aspergillose.....	15
3.7 Glykosylhydrolasen.....	16
3.8 Die Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 von <i>A. fumigatus</i>	17
3.9 Antikörper - allgemein.....	19
3.10 Antikörperformate.....	22
3.11 Antikörper-Phagen-Display-Technologie.....	23
3.12 Bakteriophagen.....	24
3.13 Antikörper-Phagen-Display.....	24
3.14 Antikörpergenbibliotheken.....	26
3.15 Selektion spezifischer Antikörperphagen (panning).....	27
4 Material.....	30
4.1 Verbrauchsmaterial.....	30
4.2 Geräte.....	31
4.3 Chemikalien.....	33
4.4 Puffer, Medien und Lösungen.....	33
4.5 Bakterien- und Pilzstämmen, Zelllinien.....	40
4.6 Plasmide.....	41
4.7 Oligonukleotide.....	41
4.8 Enzyme und zugehörige Puffer.....	43
4.9 Antikörper.....	44
4.10 Software und Datenbanken.....	44
4.11 Sonstiges.....	45
5 Methoden.....	46
5.1 Molekularbiologische Methoden.....	46

5.1.1 cDNA-Synthese.....	46
5.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	46
5.1.3 Amplifikation von DNA.....	46
5.1.3.1 Kolonie-PCR.....	47
5.1.4 <i>Nested</i> -PCR.....	47
5.1.4.1 Isolierung der Glykosylhydrolase Crf2.....	47
5.1.5 Reinigung von DNA.....	48
5.1.6 Präzipitation von DNA.....	49
5.1.7 Agarosegelelektrophorese.....	49
5.1.8 DNA Konzentrationsbestimmung – photometrisch.....	49
5.1.9 Enzymatische Restriktion von DNA.....	49
5.1.10 DNA-Dephosphorylierung.....	50
5.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten.....	50
5.1.12 DNA-Sequenzierung.....	51
5.2 Mikrobiologische Methoden.....	51
5.2.1 Produktion der Proteine Crf2 und Crf2-BAD.....	51
5.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	52
5.2.3 Herstellung der Immunantikörpergenbibliothek MAYKI.....	53
5.2.4 Infektion von <i>E. coli</i> und Produktion von M13K07-Antikörperphagen.....	53
5.2.5 Titerbestimmung von M13-Antikörperphagen.....	54
5.2.6 Selektion mit Antikörperphagenbibliotheken.....	54
5.2.6.1 Antikörperselektion in Mikrotiterplatten.....	54
5.2.6.2 Antikörperselektion in Lösung.....	55
5.2.7 Herstellung von Glycerinkulturen.....	55
5.2.8 Produktion von löslichen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten.....	56
5.2.9 Produktion von scFv-Fragmenten im Schüttelkolben.....	56
5.2.10 Kultivierung von <i>Aspergillus spp.</i> und <i>Candida albicans</i>	56
5.3 Biochemische Methoden.....	57
5.3.1 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	57
5.3.2 <i>Capture</i> -ELISA.....	58
5.3.3 <i>Bridging</i> -ELISA.....	58
5.3.4 Titerbestimmung von Serum-Antikörpern im ELISA.....	58
5.3.5 ScFv Stabilitätsanalyse.....	59
5.3.6 SDS-PAGE.....	59
5.3.7 Coomassiefärbung von Proteingelen.....	60

5.3.8 Quantifizierung von Proteinmengen.....	60
5.3.9 Western Blot.....	61
5.3.10 Immunfärbung.....	61
5.3.11 Epitop-Kartierung.....	62
5.3.12 Periplasma-Präparation (PPP) von <i>E. coli</i> -Zellen.....	62
5.3.13 Ammoniumsulfatfällung (ASF) vom Kulturüberstand.....	62
5.3.14 Affinitätschromatographie.....	63
5.3.14.1 IMAC-Reinigung von scFv-Fragmenten im <i>batch</i> -Verfahren.....	63
5.3.14.2 Reinigung von Crf2 und Crf2-BAD-Protein mittels IMAC-Säulenchromatographie.....	63
5.3.14.3 Reinigung von Crf2- und Crf2-BAD-Protein mittels IEC-Säulenchromatographie.....	64
5.3.14.4 Reinigung der scFv Fc-Fusionsproteine mittels Protein A-Affinitätschromatographie.....	64
5.4 Zellbiologische Methoden.....	65
5.4.1 Transfektion der HEK293T-Zellen.....	65
5.4.2 Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen.....	65
5.5 Biophysikalische Methoden.....	65
5.5.1 Oberflächenplasmonresonanz (SPR).....	65
5.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	66
5.6 Tierversuche.....	66
6 Ergebnisse.....	68
6.1 Isolierung der cDNA der Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 von <i>Aspergillus fumigatus</i>	68
6.1.1 Überprüfung des crf2-Transkripts als <i>splicing</i> -Variante des crf1-Gens.....	70
6.1.2 Klonierung, Produktion und Reinigung der Antigene Crf2 und Crf2-BAD.....	72
6.2 Immunisierungsstudie mit rekombinantem Crf2-Protein.....	73
6.2.1 ELISA mit den anti-Crf2-Immunsereen.....	75
6.2.2 Western Blot und Immunfärbung mit anti-Crf2-Immunsereen.....	77
6.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie mit den anti-Crf2-Immunsereen	78
6.2.4 Epitop-Kartierung mit den anti-Crf2-Immunsereen.....	79
6.3 Konstruktion der anti-Crf2 Immunantikörpergenbibliothek.....	82
6.4 Antikörperselektion gegen die Glykosylhydrolase Crf2 von <i>A. fumigatus</i>	83
6.4.1 Antikörperselektion A1 in Mikrotiterplatten mit der naiven humanen Antikörpergenbibliothek HAL4/7.....	84
6.4.2 Antikörperselektion B1 in Mikrotiterplatten mit der Makaken-Immunantikörpergenbibliothek MAYKI.....	84
6.4.3 Antikörperselektion A2 in Lösung mit der naiven humanen Antikörpergenbibliothek HAL 4/7.....	85
6.4.4 Antikörperselektion B2 in Lösung mit der Makaken-Immunantikörpergenbibliothek MAYKI.....	85

6.4.5 Zusammenfassung der unterschiedlichen Antikörperselektionsstrategien.....	86
6.5 Bioinformatische Analysen der isolierten anti-Crf2 scFv-Klone.....	87
6.6 <i>Germinality</i> -Index und <i>Humanness</i> -Analyse.....	89
6.7 Charakterisierung der anti-Crf2 scFv-Klone.....	90
6.7.1 Klonierung, Produktion und Reinigung der anti-Crf2 scFv-Klone.....	90
6.7.2 Western Blot und Immunfärbung der gereinigten anti-Crf2 scFv-Proteine.....	91
6.7.3 Test der anti-Crf2 scFv-Klone für den Crf2- <i>capture</i> -ELISA mit biotinyliertem Crf2-BAD-Protein	92
6.7.4 Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanzbestimmung.....	93
6.7.5 Stabilitätstest der anti-Crf2 scFv-Klone.....	96
6.8 Klonierung, Produktion und Reinigung der anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine.....	98
6.9 Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen.....	99
6.10 Zusammenfassung der Eigenschaften der charakterisierten anti-Crf2 Antikörperfragmente.....	102
7 Diskussion.....	103
7.1 Isolation der neuen Glykosylhydrolasen-Variante Crf2 von <i>Aspergillus fumigatus</i>	103
7.2 Aktive Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein.....	104
7.3 Generierung und Charakterisierung rekombinanter anti-Crf2-Antikörper.....	109
8 Ausblick.....	116
9 Quellenverzeichnis.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thallus eines <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von <i>A. fumigatus</i> in 450-facher Vergrößerung.....	7
Abbildung 3: Einteilung respiratorischer Aspergillosen nach Latgé (1999).....	10
Abbildung 4: <i>Aspergillus</i> -Endocarditis.....	11
Abbildung 5: Einteilung der Diagnostik der Invasiven Aspergillose nach Denning (2006).....	12
Abbildung 6: Dreidimensionale Struktur einer Glykosylhydrolase der Familie 16.....	18
Abbildung 7: Aminosäuresequenz der unprozessierten Glykosylhydrolase Crf1.....	18
Abbildung 8: Struktur von IgG-Antikörpern und unterschiedlichen Antikörperfragmenten.....	21
Abbildung 9: M13 Bakteriophage - schematische Darstellung.....	24
Abbildung 10: M13 Antikörper-Phage und Phagemid-Vektor - schematische Darstellung.....	25
Abbildung 11: Herstellung einer Antikörpergenbibliothek - schematische Darstellung.....	27
Abbildung 12: Ablauf der Antikörperselektion - schematische Darstellung.....	29
Abbildung 13: Isolierung der cDNA-Sequenzen von asp f16/crf1 und asp f9	69
Abbildung 14: Multiples Sequenz-Alignment der Aminosäuren von Asp f16, Crf, Crf2, Asp f9 und Asp f9a.....	70
Abbildung 15: Bestimmung der splicing-Donor- und Akzeptorstellen von den Transkripten crf2 und asp f9.....	71
Abbildung 16: Produktion und Reinigung des rekombinanten Proteins Crf2.....	72
Abbildung 17: Immunisierungsschema der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein.....	74
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve aus der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein	74
Abbildung 19: Schematischer Aufbau eines <i>Bridging</i> -ELISAs	75
Abbildung 20: Auswertung des <i>Bridging</i> -ELISAs im Kastendiagramm.....	76
Abbildung 21: Western Blot mit Immunfärbung mit anti-Crf2-Immunsereen.....	77
Abbildung 22: Immunfluoreszenzmikroskopie mit den anti-Crf2-Immunsereen.....	79
Abbildung 23: Epitop-Kartierung auf einer Crf2-Peptidspotmembran mit den anti-Crf2-Immunsereen.....	80
Abbildung 24: Erkannte Epitope auf einer Crf2-Peptidspotmembran mit anti-Crf2-Immunsereen.....	80
Abbildung 25: Epitop-Kartierung auf einer Crf2-, Crf1- und Asp f16-Peptidspotmembran mit anti-Crf2- Immunsereen.....	81
Abbildung 26: Erkannte Epitope auf einer Crf2-, Crf1- und Asp f16-Peptidspotmembran mit dem Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe vom Tag +7.....	82
Abbildung 27: Herstellung der anti-Crf2 Immunantikörpergenbibliothek MAYKI - schematisch.....	83
Abbildung 28: Monoklonaler ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörperselektion B1.....	85
Abbildung 29: Monoklonaler-ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörperselektion B2.....	86
Abbildung 30: Western Blot mit Immunfärbung der anti-Crf2 scFv-Klone.....	91

Abbildung 31: Crf2-capture-ELISA mit anti-Crf2 scFv-Klonen aus der Antikörperselektion B1.....	92
Abbildung 32: Crf2-capture-ELISA mit anti-Crf2 scFv-Klonen aus den Antikörperselektionen A2 und B2.....	93
Abbildung 33: Oberflächenplasmonresonanzanalyse für den scFv-Klon MS112-IIB1.....	94
Abbildung 34: Oberflächenplasmonresonanzanalyse für den scFv-Klon MS130i-IIIG3.....	95
Abbildung 35: Stabilitätsanalyse der anti-Crf2 scFv-Klone mittels Antigen-ELISA.....	98
Abbildung 36: Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen auf <i>A. fumigatus</i>	100
Abbildung 37: Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen für einen Kreuzreaktionstest auf <i>Aspergillus spp.</i> und <i>C. albicans</i>	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von <i>Aspergillus</i>	5
Tabelle 2: Vorkommen der häufigsten pathogenen <i>Aspergillus</i> -Arten und ihre prozentuale Häufigkeit bei Aspergillosen.....	8
Tabelle 3: Gemeldete Aspergillosen ab dem Jahr 2000.....	11
Tabelle 4: Klassifikation der Glykosylhydrolasen und deren Funktion.....	16
Tabelle 5: Kolonie-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil.....	47
Tabelle 6: <i>Nested</i> -PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil.....	48
Tabelle 7: Typische Zusammensetzung einer Restriktion.....	50
Tabelle 8: Typische Zusammensetzung einer Ligation.....	51
Tabelle 9: Sequenzier-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil.....	51
Tabelle 10: Zusammensetzung SDS-PAA-Proteingele.....	60
Tabelle 11: Isolierung von <i>asp f9</i> und <i>asp f16/crf</i> mittels <i>nested</i> -PCR.....	68
Tabelle 12: Zusammenfassung der analysierten Einzelklone	87
Tabelle 13: Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone	88
Tabelle 14: Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone.....	88
Tabelle 15: <i>Germinality</i> -Index und <i>Humaness</i> -Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone.....	90
Tabelle 16: Bestimmung der Bindungsparameter von anti-Crf2 scFv-Klonen zum rekombinanten Crf2 Protein. 95	
Tabelle 17: Übersicht der Stabilität der anti-Crf2 scFv-Klone.....	97
Tabelle 18: Zusammenfassung der Analysenergebnisse für die isolierten anti-Crf2 Antikörperfragmente.	102

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampicillin
A _{xyz}	Absorption bei Wellenlänge xyz
ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	<i>Aquired Immune Deficiency Syndrome</i> (erworbenes Immundefektsyndrom)
AmB	Amphotericin B TM
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Ammoniumsulfatfällung
Aspf	<i>Aspergillus fumigatus</i>
BAD	Biotin-Akzeptor-Domäne
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bla	β-Lactamase
bp	Basenpaare
BS	Braunschweig
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
CBS	zitratgepufferte Kochsalzlösung
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
C _H	<i>constant heavy</i>
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CIP	<i>Calf Intestine Protease</i>
C _L	<i>constant light</i>
Crf	Glykosylhydrolase von <i>A. fumigatus</i>
Crf2	Rekombinante Glykosylhydrolase von <i>A. fumigatus</i>
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
d. h.	das heißt
dH ₂ O	Reinstwasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DoH	Dominik Hinz

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	englisch
f	<i>forward</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
G	Glukose
xg	physikalische Gravitationskonstante
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H	<i>heavy</i>
HAL	<i>Human Antibody Library</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
His	Histidin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IA	Invasive Aspergillose
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i>
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>Immobilised Metal Ion Affinity Chromaography</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
k_a	Assoziationsrate
K_A	Gleichgewichtsassoziationskonstante
k_d	Dissoziationsrate
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KPCR	Kolonie-PCR
L	<i>light</i>
lac	Laktose
P_{lacZ}	Lac-Promotor
lat.	lateinisch
log	logarithmisch

M	Milchpulver
MAYKI	<i><u>M</u>acaque <u>A</u>ntibod<u>Y</u> <u>K</u>appa <u>I</u>mmunlibrary</i>
MTT	3(4,5-dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Mark Schütte
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	(Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	<i>molecular weight</i>
Neg.	Negativkontrolle
NBT	Nitroblautetrazolium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilo-Tri-Essigsäure
OD600	Optische Dichte bei $\lambda = 600 \text{ nm}$
ORI	<i>Origin of Replication</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCMV	Plasmid mit Cytomegalovirus Promotor
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Phage Dilution Buffer</i>
pelB	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
pET	Plasmid für Expression durch T7 RNA Polymerase
pI	isoelektrischer Punkt
PMP	peroxisomales Membranprotein (von <i>A. fumigatus</i>)
pOPE	Plasmid für optimierte, prokaryotische Proteinexpression
PP	Polypropylen
PPP	periplasmatische Präparation
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	<i>reverse</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance Units</i>
SA	Streptavidin
SAP	<i>Shrink Alkaline Phosphatase</i>

scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
scFv-Fc	<i>single chain Fragment variable Fragment crystallizable fusion</i>
SDS	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolic repression</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
<i>ssp.</i>	subspecies
SV40	simianes Virus 40
T	Tween 20
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TM	Torsten Meyer
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
V _H	<i>variable heavy</i>
V _L	<i>variable light</i>
(w/v)	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
z. B.	Zum Beispiel

2 Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitärer Schimmelpilz, der durch Inhalation seiner Sporen bei immunsupprimierten und immungeschwächten Patienten eine letale Invasive Aspergillose (IA) auslöst. Die hohe Letalitätsrate als Folge einer systemischen Mykose ist sowohl durch mangelnde diagnostische Marker gegen *A. fumigatus* als auch durch derzeit unzureichend sensitive und spezifische Nachweisverfahren begründet.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung einer artspezifischen Glykosylhydrolase von *A. fumigatus*, die sich sowohl als diagnostischer Marker für die IA als auch als Zielprotein für die Generierung rekombinanter Antikörper eignet.

Aus der mRNA eines klinischen Patientenisolats wurde die cDNA einer neuen sequenzhomologen Variante der Glykosylhydrolase Crf1 isoliert, die als Crf2 bezeichnet wurde. Rekombinant hergestelltes Crf2 erwies sich in einer aktiven Immunisierung gegen die IA im Mausmodell als protektiv und löste eine antigenspezifische B-Zellantwort aus. Diese Mäusseren konnten zur Kartierung der immunogenen Epitope von Crf2 und der sequenzhomologen Glykosylhydrolasen Crf1 und Asp f16 eingesetzt werden. In der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden mit den Immunsereen ausschließlich Bereiche aktiven Wachstums auf den Hyphen von *A. fumigatus* gefärbt und nicht seine ruhenden Sporen. Außerdem gab es keine Kreuzreaktion mit dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans*.

Für die Generierung rekombinanter Crf2-spezifischer Antikörper wurde die Phagen-Display-Technologie eingesetzt. Die Antikörperselektion wurde mit der humanen naiven Antikörpergenbibliothek HAL4/7 und der neugenerierten Makaken-Immunantikörpergenbibliothek MAYKI mit jeweils zwei unterschiedlichen Selektionsstrategien durchgeführt.

Die Analyse der isolierten rekombinanten anti-Crf2 Antikörperfragmente ergab, dass die Wahl der Selektionsmethode einen erheblichen Einfluss auf die Art der von ihnen erkannten Epitope hatte. Interessanterweise wurden gegen direkt immobilisiertes Crf2-Protein nur scFv-Fragmente gegen lineare Epitope und gegen das *in vivo* biotinylierte Crf2-Protein in Lösung nur Antikörperfragmente gegen konformationelle Epitope isoliert. Für die Antikörperfragmente, die lineare Epitope erkannten, wurde im *capture*-ELISA eine geringere Nachweisgrenze für die Detektion von löslichem Antigen festgestellt. Außerdem zeigten sie eine intensivere Färbung der Hyphen in der Immunfluoreszenz. Die rekombinanten anti-Crf2 Antikörper zeigten ein ähnliches Färbemuster wie die anti-Crf2 Mäusseren

und wiesen keine Kreuzreaktionen mit anderen humanpathogenen Pilzen auf. Mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie wurden für einige Antikörperfragmente Affinitäten im subnanomolaren Bereich bestimmt. Einige scFv-Fragmente waren zudem in humanem Serum über mehrere Wochen stabil.

Das neuentdeckte Antigen Crf2 eignet sich zusammen mit den in dieser Arbeit isolierten rekombinanten Antikörpern für den spezifischen Nachweis einer durch *A. fumigatus* verursachten IA. Zudem könnte das rekombinante Crf2-Protein als Vakzine für eine aktive Immunisierung im Vorfeld von immunsupprimierenden Behandlungen und die rekombinanten Antikörper für eine passive Immunisierung bei einer bestehenden IA eingesetzt werden.

Summary

Aspergillus fumigatus is an ubiquitous mould that causes a lethal invasive aspergillosis (IA) in immunosuppressed and immunocompromised persons via the inhalation of its spores. The high rate of lethality results from systemic mycosis is due to the absence of diagnostic markers of *A. fumigatus* as well as current deficient sensitive and specific diagnostics.

This work isolates a specific glycosylhydrolase of *A. fumigatus*, which is suitable as a diagnostic marker for the detection of the IA as well as a target protein for the generation of recombinant antibodies.

The cDNA of a new sequence homologue variant of the glycosylhydrolase crf1, called crf2, was isolated from the mRNA of a clinical isolate. The recombinant Crf2-protein was found to be protective in an active immunisation with mice against IA and elicited an antigen specific B-cell response. The immunogenic epitopes of the Crf2-protein and its sequence homologues glycosylhydrolases Crf1 and Asp f16 were determined using the mice sera. Contrary to dormant spores, with these sera were in the immunofluorescence microscopy exclusively areas of active growing stained on hyphae of *A. fumigatus*. In addition no cross reaction was determined with the humanpathogenic fungus *Candida albicans*. The phage-display-technology was used to generate recombinant anti-Crf2 antibodies. The antibody selection was performed with the human naive antibody gene library HAL 4/7 and the new generated immune antibody gene library MAYKI, derived from a macaque, in two different selection strategies.

After analyzing the isolated recombinant antibodies, it was found that the choice of selection strategy had an enormous influence on the character of the bound epitopes. Interestingly, scFvs against linear epitopes were isolated only on direct coated Crf2-protein and scFvs against conformational epitopes were isolated when the selection was performed with *in vivo* biotinylated Crf2-BAD-protein in solution. The detection limit of soluble antigen in the Crf2-capture-ELISA was lower when using scFvs binding linear epitopes. Furthermore these scFvs showed a more intensive staining of hyphae in the immunofluorescence. The recombinant anti-Crf2 antibodies had a similar staining pattern as the anti-Crf2 immune sera of Crf2-immunised mice and did not show any cross reaction with other humanpathogenic fungi. The affinity for some antibody fragments were determined via the surface plasmon resonance technology in a sub-nanomolare range. Furthermore were some of these scFvfragments stable in human sera for several weeks.

The newfound antigen Crf2, in combination with the isolated recombinant antibodies, is suitable for the specific detection of an IA caused by *A. fumigatus*. Furthermore the recombinant Crf2-protein can

be used as a vaccine for an active immunisation in intended immunosuppressive treatments and the recombinant antibodies may for a passive immunisation at a present IA.

3 Einleitung

3.1 Die Schimmelpilzgattung *Aspergillus*

Die Schimmelpilzgattung *Aspergillus* wurde 1729 erstmalig beschrieben. Seine Bezeichnung ist auf die morphologische Ähnlichkeit mit einem Aspergill (Weihwasserwedel) zurückzuführen.

Bislang sind ca. 185 unterschiedliche *Aspergillus*-Arten bekannt, wovon einige aufgrund ihrer primären oder sekundären Metabolite von industriellem Interesse sind. 33 dieser *Aspergillus*-Arten werden als humanpathogen eingestuft und können mitunter tödliche Aspergillosen verursachen [1].

Schimmelpilze wurden lange Zeit zum Reich der Pflanzen gezählt. Da ihnen aber die Pigmente für die Photosynthese fehlen, wurden sie später als eigenes Reich eingestuft. Im Reich der *Fungi* bilden sie eine große Abteilung und werden aufgrund ihrer charakteristischen Fortpflanzungsstruktur, den schlauchförmigen Asci, als *Ascomycota* bezeichnet.

Je nach Art ihrer Fortpflanzung werden Aspergillen in Anamorphe und Teleomorphe unterschieden.

Anamorphe sind Fruchtformen von imperfekten Pilzen (*Deuteromycetes*), von denen oftmals kein Meiosporangienstadium existiert, die sich also ausschließlich durch asexuell gebildete Konidien fortpflanzen. Teleomorphe hingegen bilden geschlechtliche, haploide Fruchtformen.

Schimmelpilze sind ubiquitär vorkommend, jedoch ist ihr natürlicher Lebensraum im Kompost, im Heu oder im Erdreich. Ihre Lebensweise ist entweder saprophytisch oder parasitär [2]. Die taxonomische Einordnung der Aspergillen ist in Tabelle 1 zusammengefasst [3].

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von *Aspergillus*

Domäne:	<i>Eucaryota</i>
Reich:	<i>Fungi</i> (Pilze)
Abteilung:	<i>Ascomycota</i> (Schlauchpilze)
Klasse:	<i>Ascomycetes</i> (Echte Schlauchpilze)
Unterklasse:	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordnung:	<i>Eurotiales</i>
Familie:	<i>Trichocomaceae</i>
Gattung:	<i>Aspergillus</i> (Gießkannenschimmel)
Hauptarten:	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ustus</i>

3.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus wurde erstmals 1863 von Georg Wolfgang Fresenius beschrieben, als er diesen Pilz in der menschlichen Lunge und im Respirationstrakt einer Trappe fand [4]. Die Bezeichnung *fumigatus* leitet sich vom lateinischen Begriff *fumus*, der Rauch, ab, da die pigmentierten Sporen eine rauchgrüne Farbe besitzen (Abbildung 1) [4].

Als Anamorpher vermehrt sich *A. fumigatus* über Konidien und wird als Deuteromycet in die Klasse der Hyphomyceten (Fadenpilze) und in die Ordnung der *Moniliales* eingruppiert.

A. fumigatus wächst im Vergleich zu anderen Aspergillen in Kultur besonders schnell und kann sowohl auf Pilz- als auch auf Bakterienmedien kultiviert werden. Sein Thallus ist samten bis flockig und die Färbung reicht von weiß über rauchgrün bis ins Schwarze hinein.

Als thermophiler Schimmelpilz liegt sein Wachstumsoptimum bei 37-42 °C. Seine Thermotoleranz ermöglicht ihm ein Wachstum zwischen 10 °C und 55 °C, sowie ein Überleben bei Temperaturen bis zu 70 °C [2].

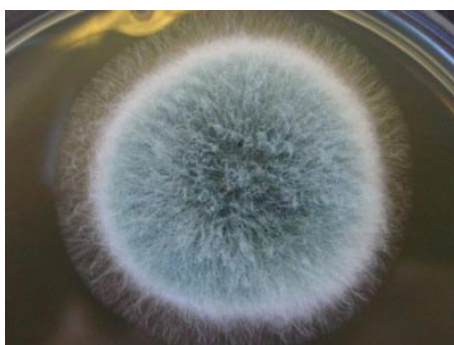


Abbildung 1: Thallus eines *Aspergillus fumigatus*

Graugrünlich gefärbter und samtener Thallus eines kultivierten *A. fumigatus* auf Malzextrakt-Agar nach vier Tagen
(© Fungal Research Trust)

Charakteristisch für *A. fumigatus* sind seine Konidiophoren und die rauchgrün pigmentierten Konidien. Die $\approx 500 \mu\text{m}$ langen Konidiophoren entwickeln sich aus einer Fußzelle, welche wiederum aus dem Substratmyzel gebildet wird. Auf dem birnenförmigen Konidiophorenvesikel sitzen die konidienbildenden Phialiden. Sie sind $\approx 6-8 \mu\text{m}$ lange und bilden $2-3 \mu\text{m}$ breite Ausstülpungen, welche die Konidien basipetal abschnüren und zu Tausenden in die Luft entlassen (Abbildung 2) .

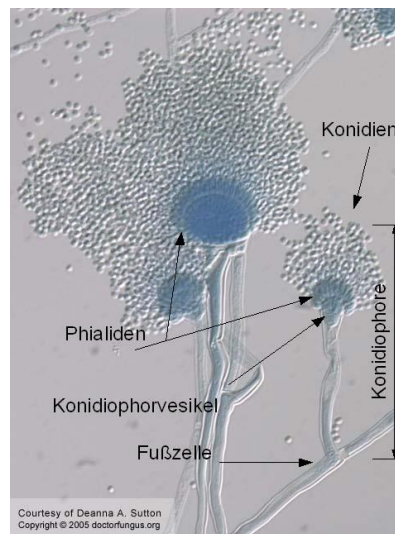


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von *A. fumigatus* in 450-facher Vergrößerung

(© doctorfungus.org)

Die Konidien besitzen einen Durchmesser von lediglich 2-3 μm . Die durchschnittliche Sporenkonzentration in freier Natur beträgt, in Abhängigkeit von der Jahreszeit, 1-15 Konidien/ m^3 Luft [5]. Diese Konzentration kann in geschlossenen Räumen, insbesondere in klimatisierten oder feuchtwarmen Gebäuden, das Hundertfache der im Freien gemessenen Werte übersteigen [6].

3.3 Mykosen

Als Mykose wird eine Infektion lebendenden Gewebes durch parasitäre Pilze bezeichnet und wird nach dem Erreger und der Lokalisation sowie nach dem Infektionsweg und der Ätiologie eingeteilt [7].

Je nach Lokalisation der Mykose wird zwischen einer topischen und einer systemischen Mykose unterschieden. Die topische Mykose ist die lokal begrenzte Mykose des Gewebes, während die systemische Mykose, auch invasive Mykose genannt, sich dadurch auszeichnet, dass der Pilz in den Blutkreislauf gelangt und sich dann im gesamten Körper ausbreitet. Bei der Einteilung nach dem Infektionsweg wird zwischen einer endogenen und einer exogenen Mykose unterschieden. Die endogene Mykose wird durch körpereigene Saprophyten verursacht, während die exogene Mykose durch körperfremde Pilze ausgelöst wird. In der Ätiologie wird die primäre Mykose durch die direkte Infektion mit einem pathogenen Pilz hervorgerufen, während die sekundäre Mykose als

Sekundärinfektion im Zusammenhang mit einer Immunsuppression o. ä. auftritt [8].

3.4 Aspergillosen

Aspergillosen sind Mykosen, die ausschließlich durch Aspergillen verursacht werden. Von den ca. 185 unterschiedlichen *Aspergillus*-Arten werden 33 als humanpathogen eingestuft. *A. fumigatus* verursacht hierbei 90 % aller Invasiven Aspergillosen (IA) [9]. In Tabelle 3 sind die häufigsten *Aspergillus*-Arten die eine Aspergillose verursachen zusammengefasst [9].

Tabelle 2: Vorkommen der häufigsten pathogenen *Aspergillus*-Arten und ihre prozentuale Häufigkeit bei Aspergillosen

Art	Globale / Regionale Verbreitung	Häufigkeit in klinischen Isolaten bei Aspergillosen
<i>A. fumigatus</i>	Weltweit ubiquitär, auf allen organischen Substanzen	In ~66 % der klinischen Isolate
<i>A. flavus</i>	Im Boden oder fett- und stärkehaltigen Samen	In ~14 % der klinischen Isolate
<i>A. terreus</i>	Im Boden, in Nahrungsmitteln	In ~5 % der klinischen Isolate
<i>A. niger</i>	Im Boden, auf Pflanzen, in Nahrung und Gewürzen	In ~5 % der klinischen Isolate
<i>A. nidulans</i>	In verrottenden organischen Substanzen	In kleinem Prozentsatz klinischer Isolate
<i>A. ustus</i>	In verrottenden organischen Substanzen	In kleinem Prozentsatz klinischer Isolate

A. fumigatus zeichnet sich aufgrund einiger spezifischer Eigenschaften als besonders pathogen aus. Von allen Aspergillen ist er der Verbreitetste und seine Sporen sind somit überall vorzufinden. Aufgrund ihrer geringen Größe überwinden die Sporen während der Inhalation die natürliche Barriere des Flimmerepithels und können somit bis zu den Bronchiolen vordringen. Dort angelangt, keimen diese aufgrund ihres Temperaturoptimums bei 37 °C Körpertemperatur aus und beginnen zu wachsen [7]. Während des Auskeimens wird das Epithel durch freigesetztes Gliotoxin und durch Proteasen angegriffen und die Elimination der Sporen durch den Wirt wird behindert [10,11].

Des Weiteren sind die Sporen von *A. fumigatus* mit einer hydrophoben Proteinschicht überzogen, die sie vor der primären Wirtsabwehr schützt. Durch ihre effiziente Bindung an Laminin und Fibrinogen sind sie nach dem Auskeimen in der Lage im Lungengewebe zu wachsen.

Bei Immunkompetenten erfolgt die Elimination der Sporen und Hyphen sowohl durch eine T_H1 als auch durch eine T_H2 T-Zellantwort [12]. Neben der Aktivierung phagozytierender alveolarer Makrophagen und Neutrophiler, kommt es zusätzlich zu einer humoralen Immunantwort mit Produktion von spezifischen Antikörpern die gegen die Antigene des Pilzes. Über den Mechanismus, über welchen die Hyphe von *A. fumigatus* nach dem Auskeimen die abluminale Oberfläche des

Endothels durchdringt und wie dieses auf eine Invasion reagiert, ist jedoch wenig bekannt [13].

Die Krankheitsbilder der Aspergillosen können nach Latgé (1999) aufgrund ihres Infektionsweges in respiratorische und nicht-respiratorische Aspergillosen unterschieden werden [7]. Nicht-respiratorische Aspergillosen betreffen beispielsweise die Infektionen des Auges, der Haut oder des Gastrointestinaltrakts. Sie kommen sowohl bei immungeschwächten, als auch bei immunkompetenten Menschen selten vor und sind als topische Mykosen für die betroffene Person nicht lebensbedrohlich [7]. Die Krankheitsbilder der respiratorischen Aspergillose lassen sich nach Infektionsort, Ausmaß und Art des Pilzwachstums in die Invasiven Aspergillosen (IA), das Aspergillom und die Allergisch Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) unterteilen (Abbildung 3). Sie ist darüber definiert, dass in allen Krankheitsformen ein invasives Wachstum durch einen *Aspergillus* erfolgt [7]. Obwohl das Aspergillom und die ABPA ein invasives Wachstum laut Definition erfordern, ist ihr Krankheitsverlauf im Gegensatz zur IA mit Dissemination in der Regel nicht tödlich. Die Schwierigkeit für den Behandelnden liegt jedoch in der frühzeitigen Differentialdiagnose der IA mit Dissemination. Als Sekundärinfektion lässt sie sich im Frühstadium, aufgrund ähnlicher Symptomatik, sowohl von bakteriellen Infekten als auch von anderen Aspergillosen nicht unterscheiden, da ähnliche bzw. die gleichen Laborparameter untersucht werden.

Die ABPA kommt häufig bei Patienten mit bestehendem Asthma und einer cystischen Fibrose (ca. 10 %) vor [14,15]. Sie äußert sich in einer allergischen Reaktion auf inhalierte und auskeimende Sporen insbesondere von *A. fumigatus*. Während des Auskeimens werden bis zu 75 verschiedene allergene Proteine frei. Diese bewirken eine T_H2 $CD4^+$ Immunantwort. Die allergische Reaktion äußert sich je nach Stadium klinisch wie Bronchialasthma mit chronischen Lungeninfiltrationen und ist schwer von einer bakteriellen Infektexazerbation zu differenzieren. In der Regel wird die Diagnose über die Eosinophilie im Blutbild und dem erhöhten IgE- und IgG-Antikörpertiter gegen Aspergillusantigene gestellt [16]. Beim Aspergillom handelt es sich um eine lokal begrenzte Mykose, die in vorbestehenden Lungenhohlräumen entsteht. Kavitätsbildende, pulmonale Vorerkrankungen, wie die kavitäre Tuberkulose oder cystische Fibrose, begünstigen die Besiedlung mit einem Aspergillom. Dieses ist in der Regel asymptomatisch und äußert sich selten in einer Hämoptyse und Asphyxie. Aus diesem Grund ist die Diagnose meist ein radiologischer Zufallsbefund, oder sie erfolgt durch einen Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Aspergillus* [7,17,18]. Wegen der guten räumlichen Abgrenzung zum restlichen Gewebe kann ein Aspergillom chirurgisch entfernt werden.

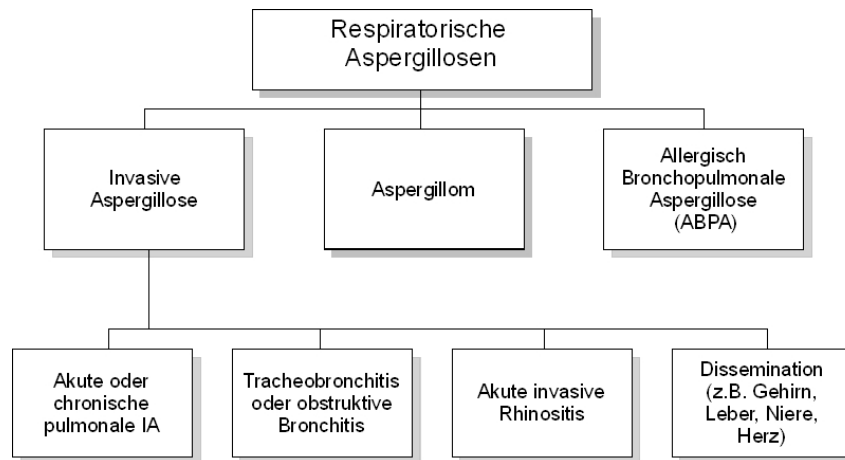


Abbildung 3: Einteilung respiratorischer Aspergillosen nach Latgé (1999)

Die Invasive Aspergillose mit Dissemination ist die schwerwiegendste Form der IA. Die Infektion erfolgt meist exogen über die Atemluft. Es sind vor allem immungeschwächte Patienten in Transplantationszentren sowie hämatologischen Abteilungen mit länger andauernder Neutropenie und pulmonalen Vorerkrankungen betroffen. Die IA mit Dissemination zählt hier zu den häufigsten Todesursachen mit einer Letalitätssrate von 50 % bei Knochenmarkstransplantierten und 80-90 % der Leukämiepatienten [7,9]. Die Dissemination erfolgt über eine hämatogene Streuung in die umliegenden Organe oder durch Penetration der Hyphen ins umliegende Gewebe. Das Zentrale Nervensystem ist mit bis zu 20 % aller IA eines der am häufigsten betroffenen Organe [19]. Des Weiteren werden häufig die Leber, die Niere, die Milz und das Herz befallen (Abbildung 4). Nach Patterson (2000) sind besonders Patienten aus folgenden Risikogruppen für eine Infektion der IA mit Dissemination gefährdet [20]:

- Patienten nach Knochenmarkstransplantation
- Personen mit hämatologisch malignen Erkrankungen (z. B. Leukämie)
- Patienten nach Transplantation solider Organe
- AIDS-Patienten
- Personen mit Lungenerkrankungen

Des Weiteren werden Patienten mit einer hochdosierten oder länger andauernden intravenösen Immunsuppression (z.B. Kortikosteroide) zu den Risikogruppen gezählt [21].

Die Zahl Invasiver Aspergillosen hat in den letzten zwei Jahrzehnten die der Invasiven Candidose, als

häufigste *post-mortem* nachgewiesene systemische Mykose, überholt [22,23]. Die Tabelle 3 fasst die Diagnosedaten der deutschen Krankenhäuser für Aspergillosen in den Jahren von 2000 bis 2007 zusammen [24]. Die Anzahl der gemeldeten Aspergillosen hat sich in diesem Zeitraum verdoppelt, die der IA sogar vervierfacht. Da gegenwärtig eine frühzeitige und eindeutige Diagnose der IA nicht möglich ist, bleibt es in vielen Fällen ein Zufallsbefund und die Dunkelziffer liegt somit bedeutend höher [25].

Tabelle 3: Gemeldete Aspergillosen ab dem Jahr 2000

ICD: „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“ [24].

ICD10		Jahr							
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
B44	Aspergillose (Gesamt)	510	568	791	812	917	866	970	1.188
B44.0	Invasive Aspergillose der Lunge	74	86	141	177	258	245	225	291
B44.1	Sonstige Aspergillosen der Lunge	218	254	352	381	437	440	560	649

Die anderen Formen der IA (Abbildung 3) sind wie die Dissemination, aufgrund ihrer atypischen Symptomatik, kaum zu diagnostizieren. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass bislang noch keine hämatogene Streuung mit einer Invasion in andere Organe von ihnen ausgegangen ist.



Abbildung 4: Aspergillus-Endocarditis

Angefärbte Hyphen von *Aspergillus* auf der Mitralklappe eines Patienten mit disseminierter Aspergillose.

(© G. Wilson, North Manchester General Hospital)

3.5 Diagnostik der Invasiven Aspergillose

Gegenwärtig ist die frühzeitige und eindeutige Diagnose der IA nicht möglich und es existiert kein Nachweisverfahren, das universell anwendbar und allein ausreichend spezifisch und sensitiv genug wäre. Der Nachweis einer IA erfolgt daher in einem fortgeschrittenen Stadium auf Basis unterschiedlich kombinierter Nachweisverfahren [9,26].

Der frühzeitigen Diagnose und der damit verbundenen Therapie der Aspergillose kommt eine hohe Bedeutung zu, da es in neutropenischen Patienten zu einer schnellen invasiven Ausbreitung der Aspergillose kommt und sie innerhalb von 14 Tagen nach Infektion zum Tod führen kann [17]. Der Zusammenhang zwischen der frühzeitigen Diagnose und dem Erfolg einer antimykotischen Therapie wurde bereits 1977 beschrieben [27].

Die Diagnostik der IA kann zum einen in den traditionellen „Goldstandard“, der den mikrobiologischen, histologischen und radiologischen Nachweis enthält und zum anderen in die molekularbiologische, nicht-kultivierungsabhängige Diagnostik unterteilt werden.

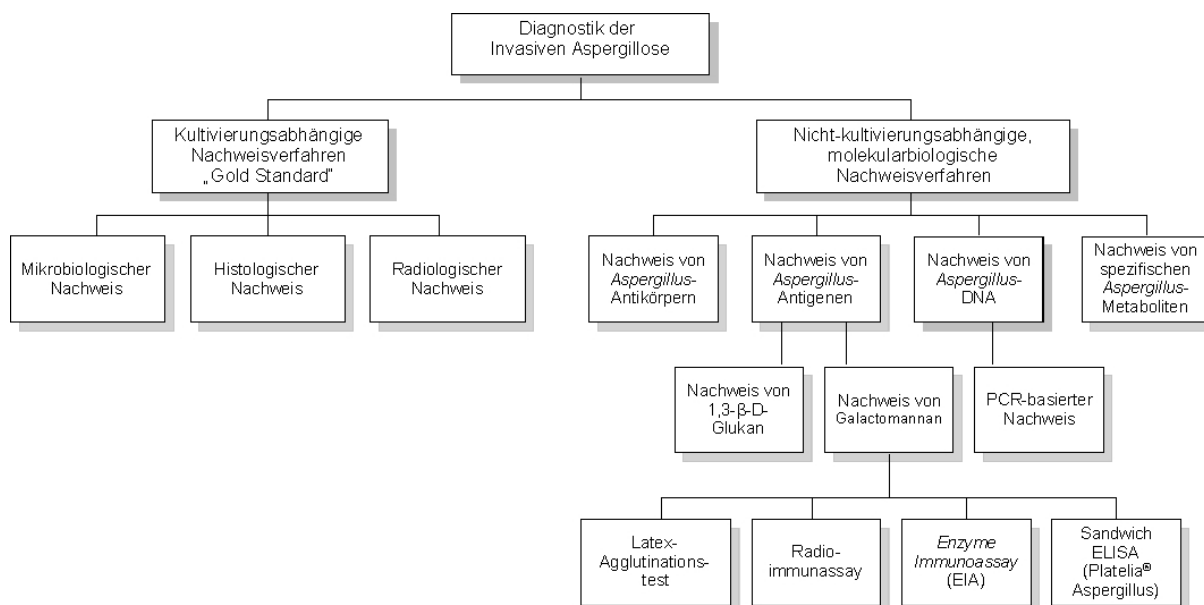


Abbildung 5: Einteilung der Diagnostik der Invasiven Aspergillose nach Denning (2006)
Einteilung in die kultivierungsabhängigen, traditionellen und in die molekularbiologischen Nachweisverfahren.

Die traditionelle, kultivierungsabhängige Diagnostik basiert auf der Entnahme von Körperflüssigkeiten und deren mikrobiologischer und histopathologischer Untersuchung auf Erreger. Der Nachteil des mikrobiologischen Nachweises ist die zeitintensive und kontaminationsanfällige

Kultivierung, die schlechte Sensitivität und der hohe Aufwand, um Pilzarten voneinander zu unterscheiden [28-30]. Die histologischen Nachweisverfahren sind ebenso aufwendig und basieren sowohl auf einer morphologischen Identifizierung des Pilzes als auch auf unterschiedlichen Färbemethoden der Pilzhyphen. Die Färbemethoden sind jedoch nicht artspezifisch und erschweren die Differentialdiagnose [28]. Zudem ist oftmals eine notwendige Gewebeentnahme den Patienten aufgrund der Erkrankung nicht zumutbar. Der radiologische Nachweis ist durch die hochauflösenden bildgebenden Verfahren der Computer- und Magnetresonanztomographie verbessert worden, jedoch muss für den radiologischen Befund bereits eine Infiltration des Gewebes erfolgt sein [17,31,32].

Daher erfolgt in der Regel bereits während der laufenden Diagnostik eine prophylaktische antimykotische oder antibakterielle Therapie, ohne den Erreger genau zu kennen. Dieser Umstand führt sowohl bei pathogenen Pilzen als auch bei Bakterien zu einer vermehrten Resistenzbildung gegen die verwendeten Medikamente.

Der kultivierungsabhängige und histologische Nachweis zählt dennoch zum „Goldstandard“ der mykologischen Diagnostik, da bislang keine besseren Nachweisverfahren für die eindeutige Diagnose der IA existieren. Zudem ist der mikrobiologische Resistenznachweis von Pilzen gegen Antimykotika für die Wahl der einzusetzenden Antimykotika von großer Bedeutung.

Die molekularbiologischen Nachweisverfahren einer IA sollen idealerweise ein schnelles und eindeutiges Ergebnis liefern und den Infektions- und Behandlungsverlauf widerspiegeln. Bisherige Ansätze sind neben dem Antigen- und Antikörpernachweis auch der Nachweis von Pilzmetaboliten und Pilz-DNA aus Körperflüssigkeiten. Der ideale Marker für den Nachweis der IA lässt sich in allen Diagnostikansätzen direkt oder indirekt im Frühstadium nachweisen und ist spezifisch für eine Infektion und nicht für eine Kolonisation. Zudem ist er nicht kreuzreaktiv mit humanen oder mikrobiellen Antigenen und spezifisch für *Aspergillus*. Des Weiteren sollte die Diagnose leicht durchführbar, kostengünstig und validiert sein [33]. Diese Anforderungen konnten jedoch bisher durch kein einzelnes Verfahren und mit keinem einzelnen diagnostischen Markern ausreichend erfüllt werden.

Ein Nachweis *Aspergillus*-spezifischer Antikörper ist für die Frühdiagnostik der IA bedingt geeignet, da aufgrund der Immunsuppression nur in einem Drittel aller Patienten spezifische Antikörper nachgewiesen werden können [1]. Bei nachgewiesenen Antikörpern ist eine Unterscheidung zwischen einer IA, einem Aspergillom und einer ABPA nicht möglich. Spezifische Antikörper können jedoch für die retrospektive Diagnose einer subakuten oder chronischen IA bei nicht-neutropenischen Patienten genutzt werden.

Für den Nachweis von Pilzantigenen werden gegenwärtig die Polysaccharide (1,3)- β -D-Glucan oder Galactomannan verwendet. Sie sind bei den meisten pathogenen Pilzen Bestandteile der Zellwand und werden von diesen während ihrer invasiven Ausbreitung ins umgebende Milieu abgegeben, so dass sie frühzeitig in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können.

(1,3)- β -D-Glucan ist als Polysaccharid ein Bestandteil der Zellwand pathogener Pilze von Gattungen wie z.B. *Aspergillus*, *Candida* und *Fusaria*. Der Nachweis mit dem kommerziellen Fungitell™ Nachweissystem erfolgt mit einer Sensitivität von lediglich 50 % bis 63 % und einer Spezifität zwischen 70 % und 93 %. Ein spezifischer Nachweis der IA ist jedoch nicht möglich weshalb dieser Test nur in Kombination mit anderen Nachweisverfahren empfohlen wird [34-37].

Galactomannan ist ein wasserlösliches Polysaccharid das sowohl im Blut als auch im Harn, in bronchoalveolaren Lavageflüssigkeiten (BAL) oder im Liquor nachgewiesen werden kann. Es soll bis zu 21 Tagen vor Auftreten klinischer Symptome einer IA detektierbar sein (persönliche Mitteilung von Dr. med. Steinmann, Uni-Klinikum Essen) [1,38,39].

Gegenwärtig kommerziell erhältliche und evaluierte Nachweissysteme sind der Latex-Agglutinationstest™ von Pasteur und der Platelia™ Sandwich-ELISA. Beide Nachweissysteme verwenden monoklonalen Rattenantikörper, die gegen Galactomannan gerichtet sind. Der Radioimmunassay und der *Enzyme Immunassay* (EIA) sind bisher weder kommerziell erhältlich noch ausreichend evaluiert. Der Latex-Agglutinationstest™ hat eine hohe Spezifität (>90 %), eignet sich jedoch nicht für den Frühnachweis der IA, da seine Nachweisgrenze mit 15 ng/mL, im Vergleich zum Platelia™ Sandwich-ELISA mit 1 ng/mL bei gleicher Spezifität, zu hoch ist [33]. Aufgrund der verwendeten Nachweisantikörper sind für beide Nachweisverfahren falsch-positive Ergebnisse beschrieben worden, da das humane Serum mit den Rattenantikörpern kreuzreagiert [1,38-41]. Ein weiterer Nachteil beider Nachweisverfahren ist das nachzuweisende Galactomannan. Dieses ist in vielen Nahrungsmitteln enthalten und wird bei einer beschädigten Darmschranke oder bei einer nicht vollständig entwickelten Darmmukosa von Neugeborenen und Kindern ins Blut resorbiert und kann mit diesem Test dann nachgewiesen werden [42,43]. Antibiotika wie Piperazillin-Tazobactam, Ampicillin-Sulbactam und Amoxicillin-Klavulansäure werden aus *Penicillium* gewonnen und enthalten ebenfalls Bestandteile von Galactomannan. Eine Antibiose mit diesen Antibiotika führt ebenso zu falsch-positiven Ergebnissen [44].

Der Nachweis von spezifischer *Aspergillus*-DNA mittels PCR ist sowohl die neueste als auch sensitivste Methode zum Nachweis einer IA. Für die PCR können entweder panfungale (gegen die 18ss-rRNA, 28s-rRNA oder mitochondriale Gene) oder artspezifische Primer (gegen die 18s-rRNA)

verwendet werden. Das DNA-*Template* für die PCR kann aus dem Blut als auch der Bronchial Lavage (BAL) gewonnen werden [45-48]. Die Fehlerquellen des PCR-Nachweises liegen jedoch in der Variation der DNA-Qualität und -Quantität sowie in der Kontamination des DNA-Ausgangsmaterials, wodurch die PCR-Ergebnisse kaum reproduzierbar werden (persönliche Mitteilung von Prof. Bautsch, Städtisches Klinikum Braunschweig).

Vielversprechend ist der Metabolit D-Mannitol von *Aspergillus*, der in mehreren Studien zum Nachweis der IA erprobt wird. Jedoch ist das Nachweisverfahren noch mit einem zu hohen Aufwand verbunden und daher aktuell nicht kommerziell erhältlich.

3.6 Therapie der Invasiven Aspergillose

Aufgrund mangelnder eindeutiger Nachweisverfahren erfolgt oft die Behandlung der IA mit Antimykotika je nach Krankheitsbild des Patienten und Standards der Kliniken prophylaktisch oder empirisch. Trotz der Nebenwirkungen durch die Antimykotika und den damit verbundenen hohen Behandlungskosten wird schon bei Verdacht auf eine IA häufig prophylaktisch mit der Therapie begonnen. Die entstehenden Gesamtkosten dieser Behandlung können mehrere tausend Euro pro Patient betragen, die oftmals aus dem Budget der Krankenhäuser bezahlt werden [49-53] (persönliche Mitteilung von Prof. Wöhrmann, Städtisches Klinikum Braunschweig).

Die gegenwärtig zugelassenen Antimykotika werden in die Gruppen der Polyene, Azole, Allyamine, Morpholine und Echinocandine eingeteilt. Die Medikamentenwahl ist bei Therapiebeginn situationsabhängig und richtet sich nach der Art der Behandlung. Das Wirkprinzip der unterschiedlichen Antimykotikagruppen beruht auf der indirekten Inhibierung der Zellwandsynthese des Pilzes [54-56]. Für die Antimykotika sind je nach Präparat sowohl massive Nebeneffekte unter der Behandlung als auch Resistenzbildungen der Pilze bekannt. Zudem liegt für einige Präparate die *response rate* nur bei 35 % und ihre hohe Leber- und Nierentoxizität erlaubt lediglich die Anwendung in einem engen therapeutischen Bereich [57]. Die wichtigsten Antimykotika sind das Polyenmakrolid Amphotericin BTM, das zu den Azolen gehörende ItrakonazolTM, das Triazol VorikonazolTM und das zu der Gruppe der Candine gehörige CaspofunginTM.

Trotz vielversprechender Ergebnisse in aktiven Immunisierungsstudien im Tiermodell gibt es gegen die IA bislang kein kommerzielles Vakzin, das den Patienten bei einer elektiven Immunsupprimierung vor einer IA schützen könnte [58-63]. Die Möglichkeit mit therapeutischen Antikörpern eine passive

Immunisierung zur Behandlung der IA durchzuführen, ist in der Literatur bislang nur beschrieben worden, wurde jedoch noch nicht praktiziert [64]. Beide Verfahren könnten in der Prophylaxe und Therapie der IA eine Alternative zur kostenintensiven und nebenwirkungsreichen antimykotischen Behandlung darstellen.

3.7 Glykosylhydrolasen

Glykosylhydrolasen bestehen aus einer umfassenden Gruppe von Enzymen, die glykosidische Bindungen zwischen zwei oder mehr Kohlenhydraten, zwischen Kohlenhydraten und Glycoproteinen bzw. zwischen Kohlenhydraten und Glycolipiden hydrolysieren. Die Klassifikation der Glykosylhydrolasen in ihre 85 unterschiedliche Familien basiert auf Sequenzhomologien und nicht auf ihrer Substratspezifität [65,66].

In Tabelle 4 ist die Enzymnomenklatur (EC) mit der Funktion der Glykosylhydrolasen zusammengefasst.

Tabelle 4: Klassifikation der Glykosylhydrolasen und deren Funktion

EC	3.	2.	1 - 3	Funktion
Klasse	3.			Hydrolase
Unterklasse	3.	2.		Glykosidase
Sub Unterklasse	3.	2.	1	Hydrolysierung von O- und S-Glykosylbindungen
Sub Unterklasse	3.	2.	2	Hydrolysierung von N-Glykosylbindungen
Sub Unterklasse	3.	2.	3	Hydrolysierung von S-Glykosylbindungen

Bislang sind für 373 unterschiedliche Arten von Organismen 1053 Glykosylhydrolasen-Sequenzen bekannt [67]. Die Familie der *Trichocomaceae* enthält für fünf *Aspergillus*-Arten 37 sequenzverschiedene Glykosylhydrolasen. Diese sind für die jeweilige Art wiederum auf unterschiedlichen Stellen des Genoms kodiert.

Allein für *A. fumigatus* sind neun unterschiedliche kodierende Sequenzen für Glykosylhydrolasen bekannt.

3.8 Die Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 von *A. fumigatus*

Die kodierenden Gensequenzen der Glykosylhydrolasen Asp f9 (*accession no. AJ223327*), Asp f16 (*AF062651*) und Crf1 (*XM_747892*) befinden sich bei *A. fumigatus* auf dem Chromosom 1 und sie werden vom identischen *open reading frame* (ORF) AFUA_1G16190 kodiert [68]. Im Rahmen der Genomsequenzierung von *A. fumigatus* wurden die cDNA-Sequenzen der Glykosylhydrolasen Asp f9 und Asp f16 von Banerjee (2001) und die des Crf1 von Niermann (2005) entdeckt. Ihre genaue enzymatische Aktivität bzw. ihre Substratspezifität ist bislang jedoch nicht geklärt.

Die drei Proteine sind spezifisch für *A. fumigatus* und gehören zur Familie 16 der Glykosylhydrolasen. Diese Familie zeichnet sich durch eine hochkonservierte Tertiärstruktur aus und wird zum Stamm der Concanavalline gezählt.

Die Glykosylhydrolasen der Familie 16 setzen sich aus Enzymen mit unterschiedlicher Substratspezifität zusammen. Sie umfassen die Lichenase (EC: 3.2.1.73), Xyloglukkanase Endotransglykosylase (XET) (EC: 2.4.1.207), β -Agarase (EC: 3.2.1.81), κ -Carrageenase (EC: 3.2.1.83), endo- β -1,3-Glukkanase (EC: 3.2.1.39), endo- β -1,3-1,4-Glukkanase (EC: 3.2.1.6) und endo-beta- β Aktosidase (EC: 3.2.1.103). Aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität sind sie an der Zellwandsynthese beteiligt und sind hauptsächlich im Bereich aktiven Wachstums lokalisiert [69-72]. Über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) sind die Antigene Asp f9, Asp f16 und Crf1 in der Zellwand verankert, sollen jedoch auch ins umgebende Milieu abgegeben werden [73]. Der GPI-Anker ist bei Glykosylhydrolasen gleichzeitig für die Morphogenese und Virulenz von *A. fumigatus* entscheidend [74].

Die exakte dreidimensionale Struktur der Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 ist nicht genau bekannt, jedoch ist diese innerhalb der Familien stark konserviert. Abbildung 6 zeigt die dreidimensionale Struktur eines endo- β -1,3-1,4-Glukkanase-Dimers der Familie 16 von *Paenibacillus macerans*. Sie besteht hauptsächlich aus zwei aufeinanderliegenden β -Faltblättern, die wiederum gemeinsam eine Spalte mit katalytischer Aktivität bilden [75].

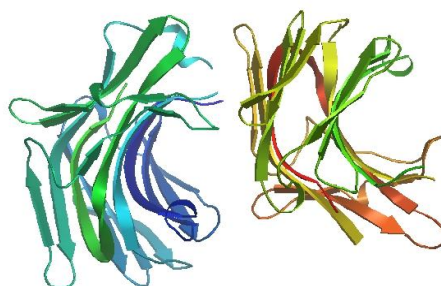


Abbildung 6: Dreidimensionale Struktur einer Glykosylhydrolase der Familie 16

Dreidimensionale Struktur eines endo- β -1,3-1,4-Glukanase Dimers der Familie 16 aus *Paenibacillus macerans* [75]

Die Aminosäuresequenz der unprozessierten Glykosylhydrolase Crf1 ist in Abbildung 7 dargestellt. An der Position 1-19 (unterstrichen) befindet sich eine Signalsequenz, die im prozessierten Kernprotein vermutlich abgespalten wird. C-terminal soll das Propeptid (Position 371-395) abgespalten werden, so dass die Kernsequenz der katalytisch aktiven Glykosylhydrolase Crf1 aus den Aminosäuren zwischen den Positionen 20-370 besteht. An der Position 319 ist das Crf1-Protein zusätzlich glykosyliert [76].

10	20	30	40	50	60	70	80	90
<u>MYFKYTAAAL</u>	<u>AAVLPLCSAQ</u>	TWSKCNPLEK	TCPPNKGLAA	STYTADFTSA	SALDQWEVTAGKVPVGPQGA	EFTVAKQGDA	PTIDTDFYFF	
100	110	120	130	140	150	160	170	180
FGKAEVVMKA	APGTGVVSSI	VLESDDLDEV	DWEVLGGDTT	QVQTNFYFGKG	DTTTYDRGTY	VPVATPQETF	HTYTIDWTKD	AVTWSIDGAV
130	140	150	160	170	180	190	200	210
DWEVLGGDTT	QVQTNFYFGKG	DTTTYDRGTY	VPVATPQETF	HTYTIDWTKD	AVTWSIDGAV	VRTLTYNDAK	GGTRFPQTPM	RLRLGSWAGG
220	230	240	250	260	270	280	290	300
DPSNPKGTIE	WAGGLTDYSA	GPYTMVVKSV	RIENANPAES	YTYSNDSGSW	QSIKFDGSVD	ISSSSSVTSS	TTSTASSASS	TSSKTPSTST
310	320	330	340	350	360	370	380	390
LATSTKATPT	PSGTSSGSNS	SSSAEPTTTG	GTGSSNTGSG	SGSGSGSGSS	SSTGSSTSAG	ASATPELSQG	<u>AAGSIKGSVT</u>	<u>ACALVFGAVA</u>
							<u>AVLAF</u>	

Abbildung 7: Aminosäuresequenz der unprozessierten Glykosylhydrolase Crf1

Die artspezifischen Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 eignen sich aufgrund ihrer Eigenschaften sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie einer IA mit rekombinanten Antikörpern. Die Antikörper sollten für therapeutische Zwecke oder einen immunhistochemischen Nachweis sowohl direkt an Hyphen binden als auch an die löslichen Glykosylhydrolasen für den serologischen Nachweis im Sandwich-ELISA. Aufgrund dieser Anforderungen wurde die Verwendung von Glykosylhydrolasen, als potentielle diagnostische Marker für Aspergillosen, in der Literatur bereits erwähnt. Des Weiteren wurde bereits durch mehrere aktive Immunisierungen gezeigt, dass sie

als Vakzine geeignet wären [59].

3.9 Antikörper - allgemein

Antikörper sind in Wirbeltieren (Vertebraten ab der Überklasse der *Gnathostomata*) ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems und besitzen innerhalb der adaptiven Immunantwort eine entscheidende Aufgabe. Über ihre funktionelle Eigenschaft bilden sie innerhalb des Immunsystems zugleich die Schnittstelle zwischen dem adaptiven und dem zellulären Immunsystem.

Antikörpermoleküle (auch als Immunglobuline bezeichnet) besitzen zwei unterschiedliche Funktionen. Die erste besteht in der spezifischen Erkennung und Bindung körperfremder Substanzen (den sogenannten Antigenen) und die zweite in der Aktivierung anderer Teile des Immunsystems zur Eliminierung dieser Fremdsubstanzen, wenn Antikörper daran gebunden sind. Beide Funktionen sind strukturell voneinander getrennt, wobei die Antigenbindung über die aminoterminal variable V-Region erfolgt und die Aktivierung des Immunsystems (auch als Effektorfunktion bezeichnet) über die konstante C-Region am Carboxylende [77].

Antikörper werden von B-Lymphozyten nach Kontakt mit einem Antigen (dem sogenannten Antigen-Stimulus) gebildet. Im Menschen werden fünf verschiedene Klassen (Isotypen) von Immunglobulinen (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE) anhand ihrer konstanten Region unterschieden. Je nachdem, welcher Isotyp an der Antigenbindung beteiligt ist, unterscheidet sich auch seine Effektorfunktion. Entsprechend der Antikörperklasse erfolgt entweder nach Bindung eine Neutralisation des Toxins, eine Opsonierung der Fremdsubstanz oder eine Aktivierung des Komplementsystems.

An der ersten Bindung eines Antikörpers mit einem Antigen sind hauptsächlich die pentameren Antikörper der Klasse IgM beteiligt. Diese Bindung wird auch als primäre humorale Immunantwort bezeichnet. Durch den Antigen-Stimulus kommt es neben der Affinitätsreifung auch zu einem möglichen Isotypenwechsel in eine der anderen Klassen der Immunglobuline, wie beispielsweise in einen IgE- oder IgG-Antikörper.

Die Y-förmigen Antikörpermoleküle bestehen als Heterotetramere aus jeweils zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten und je nach Isotyp und Multimerisierungsgrad beträgt die molekulare Masse zwischen 150 und 940 kDa [78].

IgG-Antikörper besitzen eine molekulare Masse von ca. 150 kDa, die sich aus 2x 50 kDa der schweren und 2x 25 kDa der leichten Kette zusammensetzt. Ihre Struktur wird über nicht kovalente Bindungen und über Disulfidbrücken zwischen den vier Polypeptidketten stabilisiert. Im Menschen bilden sie mit

einem Anteil von ca. 80 % die am häufigsten vorkommenden Immunglobuline im Blutserum und sind nach einer Primärantwort auf eine körperfremde Substanz in der Regel affinitätsgereift [77].

Sowohl die schwere als auch die leichte Kette bestehen aus ähnlichen, sich wiederholenden Sequenzen mit jeweils ~110 Aminosäuren. Jede Wiederholung entspricht einer Proteindomäne (Immunglobulin-domäne); bei einem IgG-Antikörper besteht die schwere Kette aus vier und die leichte Kette aus zwei dieser Domänen (Abbildung 8A). Die aminoterminalen Sequenz der ersten Domäne beider Ketten variiert zwischen verschiedenen Antikörpern deutlich und wird als variable Region (V_H und V_L) bezeichnet. Die variablen Regionen beider Ketten bilden zusammen die Antigenbinderegion F_v (*Fragment variable*) eines Antikörpers. Innerhalb der leichten Kette (V_L) wird in die Klassen λ oder κ unterschieden, wobei keine funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Klassen bekannt sind. Das Verhältnis zwischen dem Vorkommen der λ - und κ -Klasse liegt im Menschen bei 2:3 [79]. Auf die variable Region folgt jeweils eine konstante Domäne, die als C_L für die leichte und als C_{H1} für die schwere Kette bezeichnet wird. Über eine Disulfidbrücke ist die C_L - mit der C_{H1} -Domäne kovalent verbunden und bildet zusammen mit den variablen Regionen das Fab-Fragment (*Fragment antigen binding*).

Die C_{H1} -Domäne ist über eine Gelenkregion (*hinge*) flexibel mit den konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} verbunden. Die C_{H2} - und C_{H3} -Regionen beider schweren Ketten bilden das Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) und sind neben Disulfidbrücken in der *hinge*-Region über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den C_{H3} -Bereichen miteinander verbunden [80]. Das Fc-Fragment eines Antikörpers dient zur Vermittlung von Effektorfunktionen und zur Aktivierung weiterer Teile des Immunsystems. Über die glykosylierte C_{H2} -Domäne erfolgt die Komplementaktivierung und Makrophagenbindung und über den C_{H3} -Bereich die Bindung an Plasmaproteine. Zudem wirkt die C_{H3} -Domäne als Opsonin, an welches Phagozyten über ihren CR1-Rezeptor binden (Abbildung 8A).

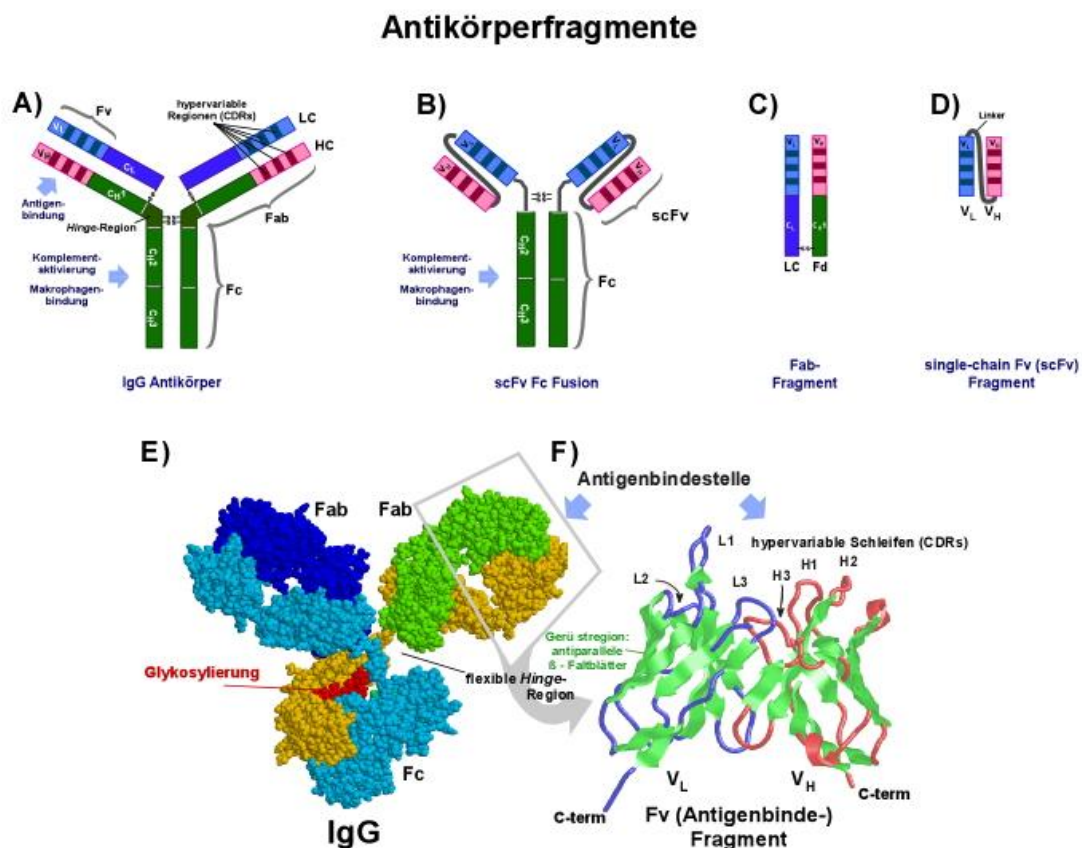


Abbildung 8: Struktur von IgG-Antikörpern und unterschiedlichen Antikörperfragmenten

A) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers; **B)** Schematische Darstellung eines scFv-Fc-Fusionsproteins; **C)** Schematische Darstellung eines Fab-Fragments; **D)** Schematische Darstellung eines scFv-Fragments; **E)** 3D-Struktur (Kalottenmodell) eines IgG-Antikörpers nach Röntgenstrukturanalyse; **F)** Schematische Darstellung der Fv-Region eines IgG-Antikörpers. Die einzelnen Schleifen der CDRs sind gesondert gekennzeichnet. Alle Abbildungen sind modifiziert nach Dübel (2007).

Innerhalb der variablen Region (Fv) gibt es je Kette drei hypervariable Regionen oder CDRs (*complementarity determining regions*), die aus 3-20 Aminosäuren bestehen und von den weniger variablen Gerüstregionen (*framework-Region*) flankiert werden [81,82].

Durch das Aneinanderlagern der V_H- und V_L-Domäne im Antikörpermolekül bilden die sechs CDRs aufgrund ihrer räumlichen Nähe einen einzigartigen hypervariablen Bereich spezifischer Struktur. Dieser Bereich ist die Antigenbindungsstelle des Antikörpers und wird als Paratop bezeichnet (Abbildung 8F). Das Paratop bindet spezifisch an seine Antigen determinante (Epitop) mit komplementärer Form. Die Bindung zwischen Paratop und Epitop ist nicht kovalenter Art, sondern beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und Van-der-Waals-Kräften [77].

3.10 Antikörperformate

Antikörperformate können sowohl durch gentechnische Methoden rekombinant als auch durch proteolytische Spaltung von Antikörpern erstellt werden.

Wird ein IgG-Antikörper mit der Protease Papain gespalten, entstehen neben dem Fc-Fragment auch zwei Fab-Fragmente. Diese bestehen jeweils aus einer vollständigen leichten Kette und dem V_H - und dem C_{H1} -Bereich der schweren Kette, die über die kovalente Disulfidbrücke am Carboxylenden vom C_L - und C_{H1} -Bereich miteinander verbunden sind (Abbildung 8C). Ihre Stabilität und Antigenbindeeigenschaften sind denen eines vollständigen IgG-Antikörpers ähnlich [83,84]. Mit der Protease Pepsin wird ein IgG-Antikörper hingegen in der *hinge*-Region gespalten und es entsteht ein bivalentes $F(ab)_2$ -Fragment. Die proteolytische Spaltung von Antikörpern zur Herstellung von Antikörperformaten wird jedoch heutzutage aufgrund von einfachen und vorteilhafteren gentechnischen Methoden nicht mehr durchgeführt.

Für Forschungszwecke oder in der Diagnostik und Therapie sind kleinere rekombinante Antikörperformate bevorzugt. Wird nur die Antigenbindeeigenschaft und nicht die Effektorfunktion der Fc-Domäne benötigt, können diese Antikörperformate für die Neutralisation von Toxinen verwendet werden. Zudem eignen sie sich aufgrund ihrer geringeren Größe in der therapeutischen Anwendung, da sie neben der schnelleren renalen Ausscheidung auch besser solide Tumoren penetrieren können [85]. Der größte Vorteil rekombinanter Antikörperformate liegt jedoch in der Möglichkeit, andere Proteine oder Immuntoxine durch gentechnische Methoden mit ihnen zu fusionieren.

Das kleinste bindende rekombinante Antikörperformat ist das scFv-Fragment (*single chain Fragment variable*). Ein scFv besteht nur aus den variablen Bereichen der schweren und der leichten Kette (V_H und V_L). Da die konstanten Domänen (C_L und C_{H1}) fehlen und daher eine kovalente Verknüpfung über diese nicht möglich ist, müssen die V_H - und V_L -Domäne über einen hydrophilen Peptidlinker miteinander verbunden werden (Abbildung 8D). Dieser linker ermöglicht die intramolekulare Anlagerung und Assoziation der V-Domänen zu einem funktionellen scFv [86,87]. Der Peptidlinker besteht aus 15-20 Aminosäuren und verbindet das Carboxylende der V_H -Domäne mit dem aminoterminalen Bereich der V_L -Domäne. Die umgekehrte Reihenfolge der Domänen ist ebenfalls möglich und kann die räumliche Anordnung begünstigen [88]. Nachteile des scFv-Formates sind die geringere Stabilität gegenüber der einem Fab-Fragment und die Neigung zur Dimer- und Aggregatsausbildung bei hohen Proteinkonzentrationen [89]. Hingegen sind die Vorteile des scFvs seine geringe Größe (ca. 25-30 kDa) und die kostengünstige Produktion in *Escherichia coli*-Zellen.

Voraussetzung ihrer Produktion in Prokaryoten ist, dass die Antikörperfragmente mit einem Signalpeptid fusioniert werden, das eine Sekretion ins oxidierende Milieu des Periplasmas gram-negativer Bakterien ermöglicht. Dort findet die Ausbildung einer intramolekularen Anlagerung zu einem funktionellen scFv statt [90]. Die Fab-Fragmente können ebenso rekombinant in eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystemen hergestellt werden. Die Vorteile des Fab-Formats gegenüber dem scFv-Format liegen zum einen in der höheren Stabilität, da kein Polypeptidlinker benötigt wird und zum anderen darin, dass bei der gentechnischen Fusion mit einem Fc-Fragment ein vollständiger Antikörper (z.B. IgG-Antikörper) erstellt werden kann.

ScFvs können ebenso mit Fc-Fragmenten über die *hinge*-Region fusioniert werden. Dieses Antikörper-format wird als scFv-Fc-Fusionsprotein bezeichnet (Abbildung 8B).

Für die Produktion der Fc-Fusionsproteine in unterschiedlichen eukaryotischen Expressionssystemen wurden schon mehrere unterschiedliche Vektoren beschrieben [91].

3.11 Antikörper-Phagen-Display-Technologie

Neben der klassischen Immunisierung und der Hybridomatechnologie stellt die Antikörper-Phagen-Display-Technologie eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern dar. Diese Technologie erfordert jedoch keine Immunisierung von Vertebraten, da die Produktion und Selektion der Antikörper in Prokaryoten erfolgt. Für die Antikörper-Phagen-Display-Technologie müssen zwei essentielle Voraussetzungen gegeben sein. Zum einen die Produktion von funktionellen Antikörperfragmenten in Prokaryoten und zum anderen die effiziente Selektion des richtigen Antikörperfragments und seiner genetischen Information [90,92].

Für die Selektion ahmt die Phagen-Display-Technologie das natürliche Funktionsprinzip von B-Lymphozyten nach, indem Geno- und Phänotyp auf einem Partikel physikalisch gekoppelt werden. Für diese Kopplung und die anschließende imitierte klonale Selektion erwies sich die Arbeit mit filamentösen Phagen als besonders robust und effizient.

3.12 Bakteriophagen

Filamentöse Phagen der Phagengruppe M13, fd und f1 sind Bakteriophagen, deren Virusgenom aus einzelsträngiger, zirkulärer DNA besteht. Sie enthält 11 Gene, von denen drei für die Replikation, drei für den Zusammenbau der Phagenpartikel und fünf für die Produktion der Hüllproteine zuständig sind. Die tubuläre Virushülle besteht hauptsächlich aus ≈ 2700 Kopien des pVIII Proteins. Einzige zusätzliche Bestandteile sind je 5 Hüllproteine des pVII und pIX am einen und pVI und pIII am anderen Ende des Partikels. Da die Bindung des Phagen über das Hüllprotein pIII an den F-Pilus seines Wirts erfolgt, können ausschließlich Zellen infiziert werden, die ein F-Plasmid oder ein F-Episom tragen. Nach Infektion töten diese Phagen nicht ihren Wirt, sondern verringern nur sein Wachstum um $\approx 50\%$. Pro infizierter Wirtszelle werden 100-200 produzierte Phagenpartikel frei, die $\approx 600\text{-}700\text{ nm}$ lang und $\approx 7\text{ nm}$ breit sind. Diese filamentösen Phagen sind resistent gegen Trypsin-verdau und erhöhte Temperaturen [93].

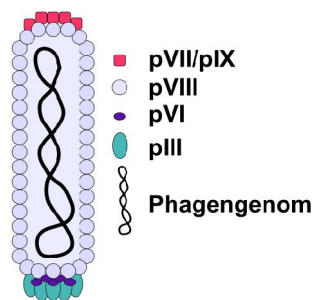


Abbildung 9: M13 Bakteriophage - schematische Darstellung

3.13 Antikörper-Phagen-Display

Das Prinzip des Phagen-Displays beruht auf der Nachahmung des natürlichen Funktionsprinzips von B-Lymphozyten: Die Kopplung von Geno- und Phänotyp. Dabei wird auf der Oberfläche des Phagenpartikels ein phagenfremdes Molekül über eine Fusion mit dem Phagenhüllprotein präsentiert, während seine genetische Information im Phagen-genom/Phagemid enthalten ist. Die genetische Information des phagenfremden Moleküls bleibt nach Infektion des Wirts erhalten und wird dort vervielfältigt. Sein Genprodukt wird nach der Replikation und Assemblierung der Phagenpartikel auf der Oberfläche dann erneut präsentiert.

Bereits 1985 konnte gezeigt werden, dass phagenfremde Peptide mit dem Hüllprotein pIII fusioniert

werden können, ohne seine Funktion stark zu beeinträchtigen, während die genetische Information des Peptids im Phagen genom enthalten war [92]. 1990 wurden mit der gleichen Methode erstmals scFv-Fragmente auf der Oberfläche von filamentösen Phagen präsentiert, jedoch konnten die Antikörper-Phagen mit dem verwendeten Expressionssystem kaum produziert werden [94,95]. Der Grund lag in dem Selektionsnachteil für den Phagenpartikel, sobald der Wirt ein für ihn toxisches Antikörper-pIII-Fusionsprotein statt eines pIII Proteins produzieren sollte. Durch Verwendung von Phagemid-Vektoren (auch als Phagen Display Vektoren bezeichnet) konnte dieser Selektionsnachteil stark abgemildert werden [94,96,97]. Ein Phagemid-Vektor besteht aus einem Plasmid, das die genetische Information für die Verpackung des filamentösen Phagen enthält. Erst durch die Anwesenheit eines Helferphagen, der die genetische Information für die Phagenreplikation beisteuert, wird die einzelsträngige Phagemid-DNA in Phagenpartikel verpackt und das Antikörper-pIII-Fusionsprotein in die Phagenoberfläche eingebaut.

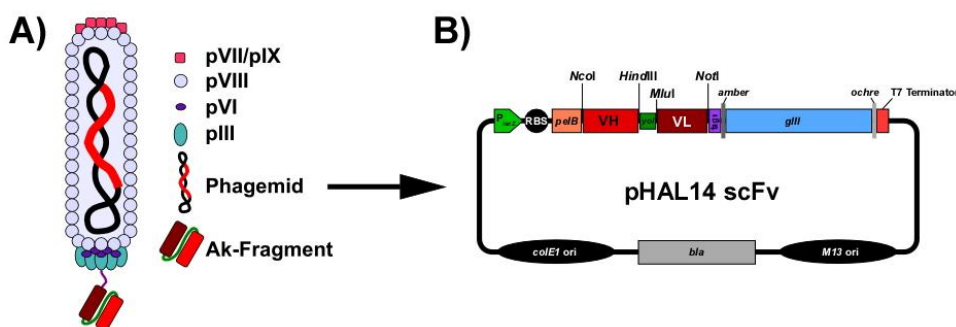


Abbildung 10: M13 Antikörper-Phage und Phagemid-Vektor - schematische Darstellung
A) Antikörper-Phage B) Phagemid-Vektor pHAL14 mit scFv

Die Expression des Fusionsproteins erfolgt zudem nicht konstitutiv, sondern unter Kontrolle eines induzierbaren *lac*-Promotors (P_{lacZ}). Dadurch wird nur während der Anwesenheit des Helferphagen das Fusionsprotein produziert und in die Phagenhülle eingebaut. Dies ist bei der Erstellung von Antikörpergenbibliotheken vorteilhaft, denn bei einer konstitutiven Expression würden in wenigen Replikationsrunden *non-sense* Mutanten dominieren.

3.14 Antikörpergenbibliotheken

Als Antikörpergenbibliothek wird in der Phagen-Display-Technologie die Gesamtheit aller Phagen bezeichnet, die sowohl die genetische Information ihres Antikörpergenfragmens auf dem Phagemid-Vektor enthalten als auch auf ihrer Oberfläche das Antikörperfragment präsentieren. Antikörpergenbibliotheken werden nach verwendetem Genrepertoire und Spenderorganismus in Immunantikörpergenbibliotheken und universelle Antikörpergenbibliotheken, zu denen die naiven, semi-synthetischen und die synthetischen Antikörpergenbibliotheken gehören, unterschieden [98]. Immunbibliotheken werden aus immunisierten Spenderorganismen hergestellt, in denen zuvor eine primäre und sekundäre Immunantwort auf das verwendete Antigen erfolgt ist. Zur Herstellung einer Immunantikörpergenbibliothek werden mit spezifischen Primersets die V-Gene IgG-sekretierender Plasmazellen amplifiziert. Das Genrepertoire enthält Antikörpergensequenzen gegen das Antigen, mit dem der Spender immunisiert wurde, nach der klonalen Selektion. Dadurch können aus einer Immunbibliothek sowohl mehr als auch höheraffinere Antikörper gegen das verwendete Antigen aus der Immunisierung isoliert werden. Damit können die monovalenten Dissoziationskonstanten von Antikörpern aus Immunbibliotheken im subnanomolaren Bereich liegen [99,100]. Der Nachteil einer Immunbibliothek liegt jedoch in ihrer geringen Diversität gegenüber anderen Antigenen, so dass die Isolierung von Antikörpern gegen Antigene, die nicht für die Immunisierung verwendet wurden, stark eingeschränkt ist.

Für die Herstellung naiver Bibliotheken wird hingegen das naive, komplette IgM-Genrepertoire aus B-Lymphozyten nicht immunisierter Spender isoliert und amplifiziert. Da die IgM-Antikörper an der primären Immunantwort beteiligt sind, beinhaltet ihr Genrepertoire Antikörpersequenzen vor der klonalen Selektion und damit eine größere Diversität. Somit können Antikörper gegen nahezu jedes Antigen isoliert werden, die aber oft eine geringere Affinität verglichen mit Antikörpern aus einer Immunbibliothek besitzen. Die Affinität der isolierten Antikörper kann jedoch bei Bedarf nachträglich mit gentechnischen Methoden erhöht werden [101]. In naiven Bibliotheken ist lediglich die Kombination der V_H - und V_L -Regionen zufällig, während in semi-synthetischen Bibliotheken in bestimmten Bereichen der Antikörpergene artifizielle Sequenzen, beispielsweise durch randomisierte CDR3-Bereiche, enthalten sind. In einer synthetischen Bibliothek werden künstliche *framework*-Regionen mit vollständig randomisierten CDR-Bereichen kombiniert, woraus die Komplexität der Antikörperbibliothek resultiert [102,103]. Die Herstellung einer Antikörpergenbibliothek erfolgt über die Klonierung amplifizierter Antikörpergensequenzen (IgG oder IgM) in ein geeignetes Phagemid-

System und die anschließende Transformation von *E. coli*-Zellen. Diese enthalten dann die vollständige Antikörpergenbibliothek. Die Verpackung der Phagemide in einen funktionellen Antikörperphagen erfolgt durch eine Infektion der transformierten *E. coli*-Zellen mit einem Helferphagen.

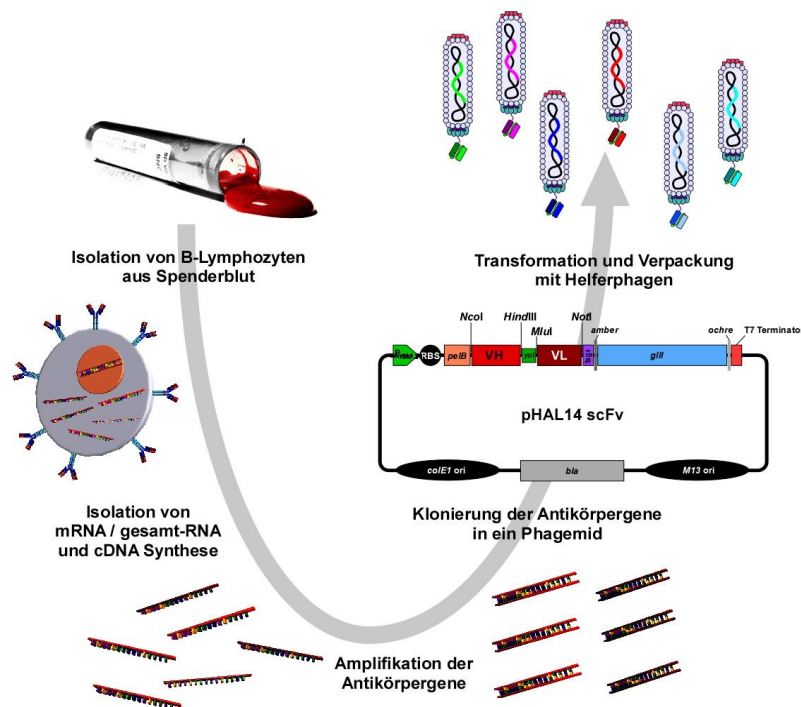


Abbildung 11: Herstellung einer Antikörpergenbibliothek - schematische Darstellung

Da die Transformationseffizienz die Komplexität einer Antikörpergenbibliothek bestimmt, werden heutzutage nur noch Phagemid-Systeme mit einer deutlich höheren Transformationseffizienz als das M13-Phagenom verwendet. Dadurch konnten auf Phagen-Display basierte Antikörpergenbibliotheken mit einer theoretischen Komplexität von 10^{10} Einzelklonen hergestellt werden [104].

3.15 Selektion spezifischer Antikörperphagen (*panning*)

Für die Antikörperselektion können verschiedene Verfahren verwendet werden, die sich in der Reihenfolge der Immobilisierung des Antigens und der Inkubation mit der Antikörpergenbibliothek unterscheiden. In Anlehnung an die Goldwäscher wird das Selektionsverfahren auch als *panning*

bezeichnet [105].

In einem ersten Schritt wird das Zielprotein, gegen das die Antikörperfragmente isoliert werden sollen, an einer festen Phase immobilisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der Antikörpergenbibliothek. Die Immobilisierung kann auf Kunststoffoberflächen von Mikrotiterplatten, in Immunoröhrchen oder an magnetischen *beads* erfolgen [96,106,107]. Wenn eine partielle Denaturierung mit Änderung der Konformation des Zielproteins durch die Immobilisierung erwartet wird, kann zuerst die Inkubation des Zielproteins mit der Antikörpergenbibliothek erfolgen. Anschließend wird das nachweismarkierte Zielprotein zusammen mit den gebundenen Antikörperphagen isoliert. Die Isolierung des gebundenen Zielproteins kann beispielsweise mit einem *pull down* über die Bindung von magnetischen Streptavidin-*beads* an biotinyliertes Antigen durchgeführt werden.

Um unspezifische Bindungen der Antikörperphagen an reaktiven Oberflächen der festen Phase zu vermeiden, wird diese zuvor mit Absättigungsreagenzien blockiert. Zusätzlich können für jedes Selektionsverfahren die Parameter so eingestellt werden, dass sie Einfluss auf die Spezifität, Stabilität und Affinität der gebundenen Antikörperphagen hat.

Unabhängig vom Selektionsverfahren werden anschließend nicht bindende Antikörperphagen in mehreren Waschschritten entfernt. Die gebundenen Antikörperphagen werden durch eine pH-Verschiebung oder durch Trypsin eluiert. Das Trypsin spaltet an der Trypsin *cleavage-site* die scFvs von den Phagen, und mit diesen werden *E. coli*-Zellen über ihren F-Pilus infiziert. Die Amplifikation der Phagenpartikel sowie der isolierten Antikörperfragmente erfolgt in den *E. coli*-Zellen über eine Coinfektion mit einem Helferphagen, der die genetische Information für die restlichen Phagenhüllproteine trägt. Für die Produktion monovalent präsentierender Antikörperphagen kann der Helferphage M13K07 und für eine oligovalente Präsentation der *Hyperphage* verwendet werden [108,109]. Dieser trägt eine Deletion im gIII-Gen und die gebildeten pIII::scFv Fusionsproteine konkurrieren nicht mehr mit dem pIII-Wildtyp. Die amplifizierten Antikörperphagen werden dann für die folgende Selektionsrunde verwendet. Nach 2-5 Selektionsrunden können spezifische Antikörperphagen selektiert und angereichert werden.

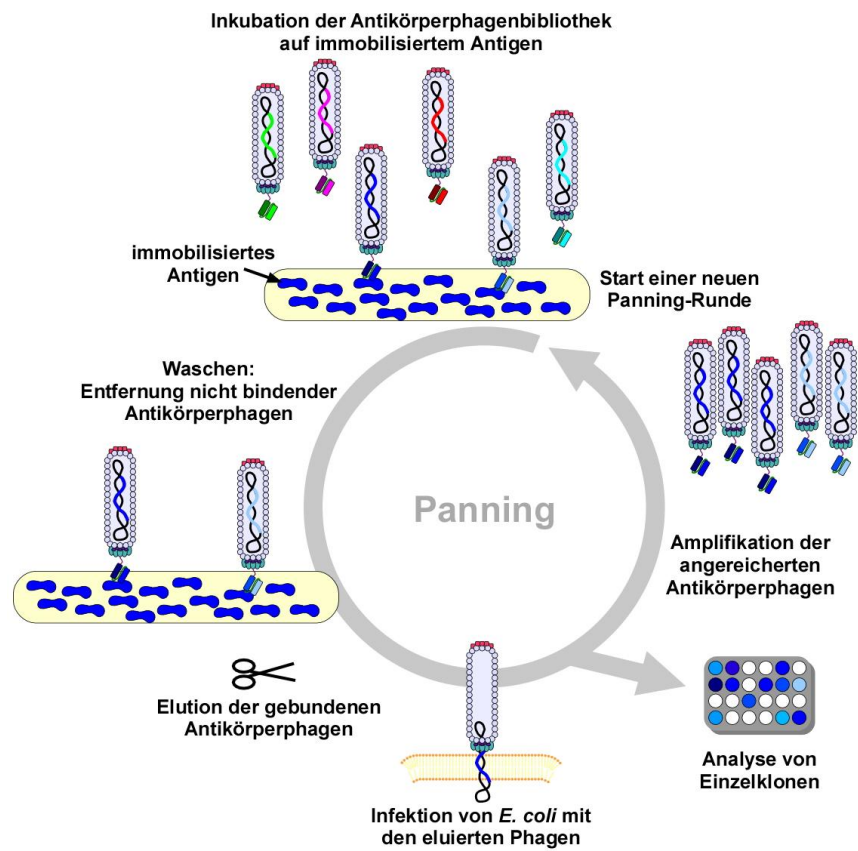


Abbildung 12: Ablauf der Antikörperselektion - schematische Darstellung

4 Material

4.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
12-well Platten <i>Tc-plate 12 well</i> Cellstar	greiner bio-one, Frickenhausen
Blutröhrchen BD Vacutainer SST <i>Tubes</i>	BD Diagnostics, Heidelberg
<i>Chelating Sepharose</i> FF	GE Healthcare, München
CM5-Chip	GE Healthcare, München
Deckgläser Ø15 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialyseschläuche Visking Typ 8/32 MWCO 14000	Carl Roth, Nürnbrecht
Einwegpipetten <i>Serological pipette</i> 2,5 mL 5 mL; 10 mL; 25 mL	Sarstedt, Nürnbrecht
Einwegspatel steril	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten <i>Gene pulser</i> 0,1 cm	BioRad, München
Filter (Celluloseacetat: 0,2 µm; 0,45 µm; 0,8 µm)	Sartorius, Göttingen
Filtertips	
100 Biosphere (1000 µL)	Sarstedt, Nürnbrecht
200 µL	nerbe plus, Winsen
FT100 (10 µL)	greiner bio-one, Frickenhausen
Gelblotting-Papier GB 002	Schleicher-Schuell, Dassel
Kits	
<i>Gen ElutTM HP Plasmid Midiprep</i>	Sigma-Aldrich, München
<i>NucleoBond Xtra Midi</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleospin Extract II</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>SuperScript First-Strand; Synthesis System for RT-PCR</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Vivaspin 6 10.000 MWCO PES	Sartorius, Göttingen
Kulturschalen	
Schale 94/16	greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischale 60x15 mm	Sarstedt, Nürnbrecht
<i>Tissue Culture Flask</i> 175 cm ²	Sarstedt, Nürnbrecht
Magnetische Streptavidin-beads <i>Dynabeads</i> M280	Invitrogen, Karlsruhe
Mikro-Schraub Röhrchen 2 mL PP	Sarstedt, Nürnbrecht
MTP – Polypropylen 96 well	greiner bio-one, Frickenhausen
MTP – Polystyrol 96 well	MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden

Material	Hersteller
MTP – Streptavidin coated 96 <i>well</i>	greiner bio-one, Frickenhausen
MTP – Polystyrol Abdeckplatte	greiner bio-one, Frickenhausen
Objektträger 76x16 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Chicago
Pipettenspitze 1000 µL/ 200 µL/ 10 µL	Sarstedt, Nürnberg
Polypropylenröhrchen 15 mL/ 50 mL	Corning, Karlsruhe
PP-Mikroplatte 96K U-Form	greiner bio-one, Frickenhausen
PVDF-Membran T830.1	Carl Roth, Nürnberg
Reaktionsgefäß 1,5 mL/ 2 mL	Sarstedt, Nürnberg
Säulen für Affinitätschromatographie	
HisTrap FF Säule (1 mL)	GE Healthcare, München
<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i>	GE Healthcare, München
<i>Resource Q</i> Säule (1 mL)	GE Healthcare, München
HiTrap rProtein A FF Säule (1 mL)	GE Healthcare, München
<i>Mab select</i> Protein A	GE Healthcare, München
Spritzen Braun Injekt 2 mL	B. Braun, Melsungen
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
Zellsieb <i>Cell Strainer</i> 70 µm Nylon	BD Biosciences, Heidelberg

4.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Apparaturen	Blot-Apparatur Trans-Blot Semi-Dry Transfer	Bio-Rad, München
	Cell	Bio-Rad, München
	Multiscreenkammer MiniProtean III	
Chromatographieanlage	ÄKTA prime	GE, Healthcare, München
Elektrophorese-Apparaturen	Biotech. Model 40-0708/ 40-314	peqlab Biotech. GmbH
	Mini Protean III	Bio-Rad, München
Elektroporator	Mikropulser	Bio-Rad, München
ELISA-Apparaturen	Reader Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim
	Washer Columbus pro-Basic	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Nalge	Nunc, Wiesbaden

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop mit Zubehör	Camera Controller C4742-95 Digitalkamera C4742-95 Lampe ebx 75 <i>isolated</i> Mikroskop Axiovert 200 Fluoreszenzfiltersatz F41-001	Hamamatsu, Herrsching Hamamatsu, Herrsching Leistungselektronik Jena GmbH Zeiss, Jena Zeiss, Jena
Geldokumentation	Geldokumentation	Intas, Göttingen
Inkubatoren	BE400 Heizblock Thermomixer <i>comfort/compact/</i> 5436 HeraCell (mit CO ₂ -Begasung) Typ BK 3256 Schüttelschrank HAT	Memmert, Schwabach Eppendorf, Hamburg Kendro Lab. Product, Hanau Ehret GmbH, Emmendingen Infors AG, Bottmingen
Lichtmikroskop	Diavert	Leica, Solms
Magnetpartikelseparator	Dynal-MPC	Invitrogen, Karlsruhe
Netzgeräte	EPS 301/601	Amersham Pharmacia, München
PCR-Gerät	<i>Thermocycler DNA-Engine</i>	Bio-Rad, München
Photometer	<i>NanoDrop</i> ND-1000 Photometer Libra S11	peqlab Biotech. GmbH, Erlangen Biochrom, Berlin
Reinstwasseranlage	arium 611	Sartorius, Göttingen
Schüttler und Wippen	Rotierapparat RA20 Rotier-Heizblock Themoshaker PST-60HL-4 Überkopfschüttler CMV 3100 Wippe GFL 3013	Gerhardt, Königswinter IKAMAG RCT, Staufen lab4you, Berlin Labortech. Fröbel GmbH Omnilab Laborzentrum
SPR-Messgerät	Biacore 2000	GE Lifescience, München
Sterilbänke	HeraSafe LaminAir HLB 2472 MSC-Advantage	Heraeus Instruments, Braunschweig Heraeus, Braunschweig Thermo Scientific, Braunschweig
Ultraschalldesintegrator	Sonotrode KE76/MS72	Bandelin electronic, Berlin
Vakuumpumpe	Vakuumpumpe	KNF Laboport, New Jersey
Vortexer	Vortex genie 2	Scientific Industries, New York
Waagen	1203 MP EMB 220-1 Analytic A 120 S	Sartorius, Göttingen Kern, Balingen-Frommern Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf 5810R Eppendorf 5415D Heraeus Instruments Biofuge Pico Sorvall RC5B Plus Sorvall RC6 Plus	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Kendro, Hanau Kendro, Hanau Thermo Electron Corp.,

Sorvall RC5 Superspeed

Kendro, Hanau

4.3 Chemikalien

Die verwendeten (Bio-) Chemikalien wurden, insofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de Haën) bezogen und entsprachen dem Reineitsgrad p.a..

4.4 Puffer, Medien und Lösungen

Die Puffer, Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Reinstwasser hergestellt. Die Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert und thermolabile Komponenten sterilfiltriert.

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Allgemeines		
PBS	NaCl	2,9 M
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	150 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50 mM
Glycerin	Glycerin steril	87 % (v/v)
Tween 20	Tween 20 (Fluka)	0,05-0,1 % (v/v)
Affinitätschromatographie (IEC, ÄKTA prime)		
Elutionspuffer pH 8,0	Tris HCl	20 mM
	NaCl	1 M
Laufpuffer pH 8,0	Tris HCl	20 mM
Affinitätschromatographie (IMAC, ÄKTA prime)		
Elutionspuffer	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	250 mM
Laufpuffer pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	0,5 M

Affinitätschromatographie (IMAC, Batchverfahren)

Bindungspuffer pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	10 mM
Elutionspuffer	EDTA in PBS	100 mM
NaCl-Lösung	NaCl	5 M
Nickellösung	NiSO ₄	100 mM
Waschpuffer	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	10-30 mM

Affinitätschromatographie (Protein A, ÄKTA prime)

Elutionspuffer pH 5,0	Tri-Natriumcitrat	100 mM
Laufpuffer pH 7,0	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	20 mM
Neutralisierungspuffer pH 9,0	Tris HCl	1 M

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	Agarose	1,5 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	25 mM
Ladepuffer	Fermentas	6 x
Laufpuffer TAE pH 8,0	Tris HCl	4 mM
	Essigsäure	2 mM
	EDTA	1 mM

Oberflächenplasmonresonanz-Analyse

EDC	EDC	0,5 M
Ethanolamin-HCl pH 8,5	Ethanolamin-HCl	1 M
Glycin-Lösung pH 2,5 - 3,0	Glycin	10 mM
NaOH-Lösung	NaOH	50 mM
Natrium-Acetat-Lösung pH 3,5-7,0	NaAc	10 mM

NHS	NHS	0,1 M
Puffer	PBS Tween20 peroxidfrei (Carl Roth)	1x 0,005 %

Coomassie-Färbung

Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
Färbelösung	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> GLR-250 Essigsäure Isopropanol	0,05 % (w/v) 10 % (v/v) 25 % (v/v)

DNA-Fällung

EtOH 100 %	EtOH analytisch	100 % (v/v)
EtOH 70 %	EtOH analytisch	70 % (v/v)
NaCl-Lösung	NaCl	1,2 M
Natriumacetat pH 5,2	Na-Ac	3 M

ELISA

Blocklösung	Milchpulver in PBST	2 % (w/v)
Blocklösung Seren-ELISA	BSA FCS Milchpulver PBS	5 % (w/v) 20 % (v/v) 2 % (w/v) 1x
BSA	BSA (Serva)	-
Entwicklerlösung (TMB Reagenz)	Lösung A Lösung B	95 % (v/v) 5 % (v/v)
Immobilisierungspuffer	PBS	1x
Lösung A pH 4,1	Tri-Kaliumcitrat Zitronensäure	30 mM 50 mM
Lösung B	TMB Aceton Ethanol H ₂ O ₂	1 mM 10 % (v/v) 90 % (v/v) 0,3 % (v/v)
PBST	Tween 20 in PBS	0,05 - 0,1 % (v/v)
Stopplösung	H ₂ SO ₄	1N

Waschpuffer	Tween 20 in PBS	0,05 % (v/v)
-------------	-----------------	--------------

Expression und Reiniung von Proteinen

PE-Puffer pH 8,0	EDTA Saccharose Tris HCl	1 mM 20 % (w/v) 50 mM
------------------	--------------------------------	-----------------------------

Fluoreszenzmikroskopie

Blocklösung	BSA Milchpulver PBS Tween 20	3 % (w/v) 2 % (w/v) 1x 0,05 % (v/v)
Immersionsöl	Immersol™ 518 F (Zeiss)	-
Mowiol/Dabco	Mowiol Dabco	100 % (v/v) 0,1 % (v/v)
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin P4707 (Sigma)	0,01 % (v/v)
Waschpuffer	PBS	1x

Immunoblot (allgemein)

Laufpuffer pH 8,3	Glycin Tris HCl	192 mM 25 mM
-------------------	--------------------	-----------------

Immunoblot (AP-Konjugat)

BCIP-Lösung	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat Dimethylformamid	1,5 % (w/v) 100 % (v/v)
Blocklösung	Milchpulver in PBST	2 % (w/v)
NBT-Lösung	Dimethylformamid NBT	70 % (w/v) 3,0 % (w/v)
Substratpuffer pH 9,5	Tris HCl MgCl ₂	100 mM 0,5 mM
Waschpuffer	PBS Tween 20	1x 0,1 % (v/v)

Isolierung von Plasmid-DNA

Isopropanol	Isopropanol	100 % (v/v)
Lösung S1 pH 8,0	EDTA Rnase A Tris HCl	10 mM 0,04 % (w/v) 0,5 M
Lösung S2	NaOH SDS	0,2 M 35 mM
Lösung S3 pH 4,8	Essigsäure	29,5 % (v/v)

Medien und Supplemente**Prokaryotische Kultivierung**

2x YT Flüssigmedium (pH 7,0)	Bacto-Hefeextrakt Bacto-Trypton NaCl	1,0 % (w/v) 1,6 % (w/v) 0,05 % (w/v)
2x YT Agar	Bacto-Agar in 2x YT Medium	1,5 % (w/v)
2x YT-AK Flüssigmedium	2x YT-Medium Ampicillin Kanamycin	 100 mg/L 50 mg/L
2x YT-GA Flüssigmedium	2x YT-Medium Glukose Ampicillin	 100 mM 100 mg/L
2x YT-T Flüssigmedium	2x YT-Medium Tetracyclin	 50 mg/L
Ampicillin	Ampicillin	100 mg/mL
Kanamycin	Kanamycin	50 mg/mL
Tetracyclin	Tetracyclin	10 mg/mL in Ethanol
ASPA+N pH 5,5 (50x)	KCl KH ₂ PO ₄	350 mM 550 mM
Glukoselösung	Glukose	2 M
IPTG-Lösung	IPTG	1 M
Mg ²⁺ -Lösung	MgCl ₂ MgSO ₄	1 M 1 M
SOC Medium	Bacto-Hefeextrakt Bacto-Trypton NaCl MgCl ₂ Glukose	0,5 % (w/v) 2,0 % (w/v) 0,005 % (w/v) 20 mM 20 mM

Pilzkultivierung

Allgemeines Medium für Hefen	Agar	1,5 % (w/v)
	Glukose	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,3 % (w/v)
	Malzextrakt	0,3 % (w/v)
	Pepton von Sojabohnen	0,5 % (w/v)
Complete Medium	ASPA+N (s.o.)	1x
	Glukose	1,0 % (w/v)
	MgSO ₄	2 mM
	Spurenelemente (s.u.)	1x
	Casaminosäuren (Difco)	0,1 % (w/v)
	Hefeextrakt (Difco)	0,5 % (w/v)
	Vitamine (s.u.)	1x
Czapek-Dox-Agar pH 7,2 (130)	Uridin	10 mM
	Agar	1,3 % (w/v)
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,001 % (w/v)
	KCl	0,05 % (w/v)
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 % (w/v)
	NaNO ₃	0,3 % (w/v)
	Saccharose	3 % (w/v)
DMEM High Glucose (4,5%) with L-Glutamine	DMEM (PAA Laboratories GmbH)	1x
	Fötale Kälber Serum (FCS)	4-8 %
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
Kartoffel-Dextrose-Agar (129)	Agar	1,5 % (w/v)
	Glucose	2 % (w/v)
	Kartoffelstärke	0,4 % (w/v)
RPMI 1640	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH)	-
Spurenelemente (1000x)	ZnSO ₄	76 mM
	H ₃ BO ₃	178 mM
	MnCl ₂	25 mM
	FeSO ₄	18 mM
	CoCl ₂	7,1 mM
	CuSO ₄	6,4 mM
	Na ₂ MoO ₄	6,2 mM
Vitamine (1000x)	EDTA	174 mM
	Thiamin	10 % (w/v)
	Riboflavin	10 % (w/v)
	Nicotinamid	10 % (w/v)
	Pyroxidin	5 % (w/v)
	Pantothensäure	1 % (w/v)
	Biotin	0,02 % (w/v)

Eukaryotische Kultivierung

Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin	1 M
DMEM (High Glucose)	FCS	8 %
	Penicillin/Streptomycin (100x)	1 %
RPMI 1640	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH)	-

PCR

dNTPs	dNTPs (Fermentas)	10 mM
-------	-------------------	-------

Proteinquantifizierung

Bradford-Reagenz	Bradford-Reagenz (Bio-Rad)	5x
------------------	----------------------------	----

SDS-PAGE

Acrylamidmix	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
APS-Lösung	APS	10 % (w/v)
Laemmli-Puffer (5x)	s-s-β-Mercaptoethanol	15 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
Laufpuffer mit SDS pH 8,3	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris HCl	25 mM
SDS-Lösung	SDS	10 % (w/v)
Tris HCl-Lösung pH 6,8	Tris HCl	1,5 M
Tris HCl-Lösung pH 8,8	Tris HCl	1,5 M

Silberfärbung

Fixierlösung	Stopplösung	99,95 % (v/v)
	37 % (v/v) Formaldehyd	0,05 % (v/v)
Ethanol	Ethanol	50 % (v/v)
Natriumthiosulfatlösung	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	20 % (w/v)

Silberlösung	20 % (w/v) AgNO ₃ 37 % (v/v) Formaldehyd	1 % (v/v) 0,075 % (v/v)
Entwicklerlösung	Na ₂ CO ₃ 37 % (v/v) Formaldehyd Natriumthiosulfatlösung	6 % (w/v) 0,05 % (v/v) 2 % (v/v)
Stopplösung	Methanol Essigsäure	50 % (v/v) 12 % (v/v)

4.5 Bakterien- und Pilzstämmen, Zelllinien

Bakterienstämmen	Bezeichnung	Eigenschaften/ Kultivierung	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	-	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F'</i> [<i>proAB</i> + <i>lac^a</i> ZDM15 TN10(tet ^R)]	Stratagene, Amsterdam, Niederland
<i>E. coli</i> BLR(DE3)	-	F- <i>ompT hsdS_B (r-m-b) gal dcm (srl-rec)306::Tn10(Tc^R)</i> (DE3)	Novagen, Karlsruhe, Deutschland

Pilzstämmen	Bezeichnung	Eigenschaften/ Kultivierung	Herkunft/ Referenz
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	D 141	Complete Medium, Kartoffel-Dextrose-Agar	(Staib <i>et al.</i> , 1980)
<i>Aspergillus flavus</i>	DSM 818; ATCC 10124	Complete Medium, Kartoffel-Dextrose-Agar	DSMZ Braunschweig
<i>Aspergillus clavatus</i> Desmazieres	DSM 3410; ATCC 18214	Complete Medium, Czapek-Dox-Agar	DSMZ Braunschweig
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	DSM 1958; ATCC10690	Complete Medium, Kartoffel-Dextrose-Agar	DSMZ Braunschweig
<i>Emmericella nidulans</i> (Eidam) Vuillemin	DSM 970	Complete Medium, Kartoffel-Dextrose-Agar	DSMZ Braunschweig
<i>Candida albicans</i>	DSM 3454; ATCC 32032	Complete Medium, Allgemeines Medium für Hefen	DSMZ Braunschweig

Zelllinie	Bezeichnung	Eigenschaften/ Kultivierung	Herkunft/ Referenz
HEK293T	ATCC CRL-11268	Humane embryonale Nierenzellen, adhären wachsend, transformiert mit SV40 Large-T-Antigen	Sena-Esteves <i>et al.</i> 1999

4.6 Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck
pCMV-hIgG1-Fc-XP	Eukaryotischer Expressionsvektor; Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen
pET21A+-Crf2	Prokaryotischer Expressionsvektor pET21A+Crf2 für Antigenexpression (Novagen)
pET21A+-Crf2+ BAD	Prokaryotischer Expressionsvektor pET21A+Crf2+BAD für Antigenexpression; enthält N-terminal eine Biotinylierungsakzeptordomäne (Novagen)
pHAL14	Phagemid-Vektor, Klonierung von Antikörpergenbibliotheken, Phagen-Display
pLA131	Prokaryotischer Expressionsvektor, Quelle für Biotinylierungsakzeptordomäne
pOPE101-XP	Prokaryotischer Expressionsvektor, Produktion von AK-Fragmenten
pLA131	Prokaryotischer Expressionsvektor, Quelle für Biotinylierungsakzeptordomäne
pRARE3	Hilfsvektor zur <i>in vivo</i> Biotinylierung

4.7 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Annealing-temperatur	Verwendungszweck
MK-Af-Crf1_f1	agcagccctagctgcggtgc	63 °C	Amplifikation des Antigens asp f9, asp f16 und <i>crf1</i> aus Patientenseren (<i>nested</i> -PCR)
MK-Af-Crf1_r1	ataagaacgatggagtagtc	63 °C	
MS_Asp16_NheI	atataagctagcgacagacttggtcaagtgaat	63 °C	
MS_Crf1_rNotI_1	tattatgcgccgcgaatgccaacacggcagcg	63 °C	
MS_Crf1_rNotI_2	tattatgcgccgcgctcgaggtagagctggcgga	63 °C	
MHET21_f1	gagcggataacaattcccc	56 °C	Kolonie-PCR für pET21a(+)-Crf2
MHET21_r1	ccttcgactcaaccgacg	56 °C	
MHMacVH-NcoI_f1	gtcctcgaccatggccsaggtgcagctcgagsagtctggg	57 °C	Amplifikation der V _H Antikörper-gensequenz aus den pGemT Vektor
MHMacVH-NcoI_f2	gtcctcgacacccatggcccaggtgcagctrcctcgagctckgg	57 °C	
MHMacVH-	gtcctcgacacccatggccsaggtgcagctgctcgagctckgg	57 °C	

<i>NcoI_f3</i>			
MHMacVH- <i>NcoI_f4</i>	gtcctcgcac <u>ccatgg</u> cccaggtacagctcgagcagtcagg	57 °C	
MHMacVH- <i>NcoI_f5</i>	gtcctcgcac <u>ccatgg</u> cccaggtgcagctgctcgagtctgg	57 °C	
MHMacVH- <i>NcoI_f6</i>	gtcctcgcac <u>ccatgg</u> cccaggtgcagctctcgcagtsggg	57 °C	
MHMacIgGCH1 scFv- <i>HindIII_r</i>	gtcctcgcac <u>aagctt</u> tgggcccttggt gga	57 °C	
MHMacVK- <i>MluI_f1</i>	accgcctcc <u>acgcg</u> tagahatcgagctcacncagtcctcc	57 °C	Amplifikation der VK- Antikörpergenesequenz aus dem pGemT Vektor
MHMacVK- <i>MluI_f6</i>	accgcctcc <u>acgcg</u> tagagctccwgtgacmcagtcctcc	57 °C	
MHMacKappaCL - <i>NotI_r</i>	accgcctcc <u>cgccgcgcg</u> acacagatggtgsagccac	57 °C	
MhglIII_r	cctttctgctgttttgaaatc	56 °C	Amplifikation aus pHAL14
MhlacZpro_f	ggctcgtatgttggtgtgg	56 °C	
MHpOPE_f2	cttagattcaattgtgagcgg	56 °C	Amplifikation aus pOPE101-XP
MHpOPE_r2	ctgatcattagcacaggcc	56 °C	
MKpelB_f	gcctacggcagccgctgg	56 °C	Sequenzierung aus pHAL14
Tor-pCMV- mIgG1-FC-seq_f	cactttgcctttctctcc	56 °C	Amplifikation / Sequenzierung der anti-Crf2 scFv-Fc- Fusionsproteine aus pCMV2.2- hIgG1-Fc-XP
CM2 CMV-	cgcaaatggcggttaggcgtg	56 °C	
TS_pCMV2.2_r	agcttctagacgcactcatttaccggggacagggaga	56 °C	
ToR-pCMV-Seq-R	cgctcagaagccatagag	56 °C	
NS20-TS_SEQ hIgG1-CH2_r1	caggagttcaggtgctgg	56 °C	

4.8 Enzyme und zugehörige Puffer

Verwendete Enzyme und Puffer

Enzym/Puffer	Hersteller
BSA analytisch 100x	New England BioLabs (NEB)
CIP	New England BioLabs (NEB)
CIAP-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta
Phusion HF Reaktionspuffer 5x	Finnzymes, Keilaranta
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma, St. Louis
RedTaq PCR Reaktionspuffer 10x	Sigma, St. Louis
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs (NEB); MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktions-Puffer NEB3	New England BioLabs (NEB)
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase Puffer 10x	Promega, Mannheim
Trypsin	Sigma, München

4.9 Antikörper

Antikörper	Verdünnungen/Konzentration			Hersteller
	ELISA	Immunfärbung	Fluoreszenz-mikroskopie	
Ziege-anti-Mensch IgG Fc-spezifisch (H+L) FITC-konj. ALEXA Fluor 448	-	-	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-anti-Maus-IgG Fc-spezifisch AP-konj.	-	1:10000	-	Sigma-Aldrich, München
Ziege-anti-Maus IgG Fc-spezifisch HRP-konj.	1:25000	1:20000	-	Sigma-Aldrich, München
Maus-anti-penta-His-tag	1:10000	-	-	Quiagen, Hilden
Maus-anti-C-Myc-tag (9E10/21)	1:1000	1:500	-	AG Dübel
Maus-anti-pIII	1:10000	1:2000	-	MoBiTec, Berlin
Streptavidin HRP-konj.	1 µg/mL	-	-	Jackson ImmunoResearch, Suffolk

4.10 Software und Datenbanken

Software	Referenz/Anwendung	
BIAevaluation 4.1	Auswertung der SPR Analysen, Biacore 2000	GE Healthcare, München
Finch TV 1.4.0	Darstellung von Sequenzierdaten	Geospiza Inc., USA www.geospiza.com , 22.03.2009
Gimp 2.6	Bildbearbeitung	http://www.gimp.org/ , 22.03.2009
ImageJ	Quantifizierung von Proteinen Auswertung von Mikroskopieaufnahmen	Nat. Institutes of Health http://rsbweb.nih.gov/ij/ , 22.03.2009
Inkscape	Bildbearbeitung	http://www.inkscape.org , 22.03.2009
LSM image browser	Auswertung von Mikroskopieaufnahmen	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
MultAlin	Abgleich mehrerer Sequenzen mit hierarchischem Aufbau (Corpet 1988)	http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html , 09.01.2009
OpenOffice.org 2.3	Protokolle, Zeichnungen, Berechnungen, Präsentationen	http://www.openoffice.org/ , 22.03.2009
Qtiplot 0.9.7.4	Erzeugung von Diagrammen	http://soft.proindependent.com/qtiplot.html , 22.03.2009
Unicorn 5.10	Auswertung Chromatographie, Äkta prime™	GE Healthcare, München

Vektor NTI Suite 9	Erstellen von Vektorkarten	InforMax Inc., USA
Zotero	Literaturverwaltung	http://www.zotero.org/ , 22.03.2009

Datenbank	Anwendung/Referenz	
EMBL-EBI	Abgleich von Nukleotidsequenzen mit der Datenbank	http://www.ebi.ac.uk/embl/ , 22.03.2009
EMBOSS Transeq	Translation von Nukleinsäuresequenzen in die entsprechenden Aminosäuresequenzen	http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html , 22.03.2009
ExPASy ProtParam	Ermittlung von pI-Werten (Gasteiger et al. 2005)	http://www.expasy.ch/ , 22.03.2009
IMGT	Analyse von Antikörpersequenzen	http://imgt-cines.fr/ , 22.03.2009
NCBI	Datenbank für Gen- und Proteinsequenzen, Literaturdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ , 22.03.2009
NetAspGene 1.0	Bestimmung von <i>splicing-sites</i> im Genom des <i>Aspergillus fumigatus</i> (Wang et al. 2008)	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAspGene/ , 22.03.2009
SHAB	Analyse von Antikörpersequenzen (Abhinandan & Martin, 2007)	http://www.bioinf.org.uk/abs/shab/ , 22.03.2009
SIB BLAST Network Service Swiss Institute of Bioinformatics	Abgleichen von Proteinsequenzen mit der Datenbank	http://www.expasy.ch/tools/blast/ , 22.03.2009
VBASE2-Datenbank	Analyse von Antikörpersequenzen (Retter <i>et al.</i> , 2005)	http://www.vbase2.org/ , 22.03.2009

4.11 Sonstiges

Produkt	Hersteller
Agarosegel-Ladepuffer 6x	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Massenstandard:	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Generuler™ 100 bp DNA ladder	
Generuler™ 1 kb plus DNA ladder	
dNTPs	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Helferphage M13K07	GE Healthcare, München
Injektionslösungen (für Sequenzierungen)	Millipore, Eschborn
PDEA	GE Healthcare, München
Protein-Massenstandard:	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein Standard™	
Precision Plus Protein Standard prestained™	

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 cDNA-Synthese

Die mRNA von *Aspergillus fumigatus*, die aus kultiviertem Patientenmaterial isoliert wurde, stand für die cDNA-Synthese bereits zur Verfügung. Die RT-PCR wurde gemäß Herstellerangabe mit 10 ng mRNA und dem *SuperScript First-Strand, Synthesis System for RT-PCR Kit* und Oligo dT Primern durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde photometrisch vermessen und für die *nested*-PCR verwendet.

5.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *illustra™ GFX™ Micro Plasmid PrepKit* oder dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* aus ü.N. *E. coli*-Flüssigkulturen isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit Elutionspuffer (10 mM Tris; pH 8,0) oder dH₂O. Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

5.1.3 Amplifikation von DNA

Mit der Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurden DNA-Sequenzen exponentiell amplifiziert. Flankierende, komplementäre Oligonukleotide (Primer) determinierten den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Es wurden präparative PCRs und *nested*-PCRs zur Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente durchgeführt. Für die jeweiligen PCR-Methoden sind die Zusammensetzungen und die zugehörigen Temperaturverläufe gesondert aufgeführt.

5.1.3.1 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurde als DNA-*Template* eine Bakterieneinzelkolonie verwendet, die steril in den PCR-Amplifikationsansatz überführt wurde. In der Denaturierungsphase wurden die Zellen thermisch aufgeschlossen und die freigewordene DNA diente als DNA-*Template* der präparativen PCR. Diese PCR-Methode ermöglicht eine schnelle und einfache Analyse auf Vorhandensein der zu amplifizierenden DNA in der Bakterieneinzelkolonie.

Tabelle 5: Kolonie-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil

Komponente	Volumen [μ L]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit t [s]
Sterile Bakterieneinzelkolonie	~1	98	120
RED <i>Taq</i> TM DNA-Polymerase (1 U/ μ L)	1	94	60
10x RED <i>Taq</i> TM PCR Reaktion Buffer	5	65/56/55	30
40 mM dNTPs (10 mM jeweils)	1	72	30
Primer <i>forward</i> (10 pmol/ μ L)	0,5	72	600
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/ μ L)	0,5	16	∞
dH ₂ O	41		

} 30x

Primerpaare	Primerset zum Nachweis von	Temperatur [$^{\circ}$ C]
MHLacZ Pro_f / MHgIII_r1	pHAL14 basierten Plasmiden	65
MKpelB_f / MKmyc_r	pOPE101 basierten Plasmiden	55
MHET21_f / MHET21_r	pET21 basierten Plasmiden	56

5.1.4 Nested-PCR

Geringe DNA-Mengen können mittels *nested*-PCR amplifiziert werden. Hierbei wird nach einer primären PCR ein zweites Primerpaar eingesetzt, das innerhalb des amplifizierten Segments liegt. Diese PCR-Methode dient der sehr spezifischen Amplifikation von Genfragmenten geringster Konzentration aus genomischer DNA.

5.1.4.1 Isolierung der Glykosylhydrolase Crf2

Mittels spezifischer Primerpaare sollten in unterschiedlichen *nested*-PCR-Ansätzen die cDNA-Sequenzen von *asp f9*, *asp f16* und *crf1* isoliert und amplifiziert werden. Als Ausgangsmaterial stand die isolierte und synthetisierte Gesamt-cDNA von *Aspergillus fumigatus* zur Verfügung. Im ersten PCR-Ansatz ist der 5'-Primer MK-AF-Crf1-f1 und der 3'-Primer MK-AF-Crf1-r1 für alle drei

Gensequenzen identisch. Der 5'-Primer und der 3'-Primer befinden sich im nicht kodierenden Bereich der drei Antigene. Für die zweiten 30 PCR-Zyklen, mit jeweils 2 µL DNA-Template aus den ersten Amplifikationen, wurde für alle drei zu isolierenden cDNA-Sequenzen der 5'-Primer MS_Asp_f16_NheI verwendet, dessen Sequenz die Restriktions-schnittstelle *NheI* enthält. Zur Amplifikation der *asp f9* Gensequenz wurde der 3'-Primer MS_Aspf9_r_NotI sowie für die homologen cDNA-Sequenzen von *asp f16* und *crf1* der 3'-Primer MS_Crf_r_NotI verwendet. Beide 3'-Primersequenzen enthalten jeweils die Restriktionsschnittstelle *NotI*. Die Zusammensetzung des verwendeten PCR-Ansatzes ist in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Nested-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil

Komponente	Volumen [µL]	Temperatur [°C]	Zeit t [s]
DNA-Template	~1	98	120
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (5 U µL ⁻¹)	0,5	64/60/56	30
5x Phusion HF Buffer	10		
40 mM dNTPs (10 mM jeweils)	1		
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µL)	0,5	72	30
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µL)	0,5	72	600
dH ₂ O	41	16	∞

Primerpaare		Primerset zur Amplifikation von	Temperatur [°C]
forward	reverse		
MK-Af-Crf1_f1	MK-Af-Crf1_r1	1. PCR <i>asp f9</i> , <i>asp f16</i> und <i>crf1</i>	56 und 60
MS_Aspf16_NheI	MS_Crf1_r-NotI_1	2. PCR; Amplifikation von <i>asp f16</i> und <i>crf1</i>	60 und 64
MS_Aspf16_NheI	MS_Crf1_r-NotI_2	2. PCR; Amplifikation von <i>asp f9</i>	60 und 64

5.1.5 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen (z.B. PCR-Ansätze) oder Agarosegelen erfolgte mittels *illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit* gemäß der Herstellerangabe. Die DNA wurde mit 10-50 µL Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0) oder mit 10-50 µL dH₂O eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt.

5.1.6 Präzipitation von DNA

Die DNA-Präzipitation kann zur Umpufferung von DNA-Lösungen (z. B. nach Ligation) eingesetzt werden. Die DNA-Lösung wurde mit dH₂O auf 100 µL aufgefüllt. Es wurden 10 µL 3 M NaAcetat und 250 µL Ethanol (100 %) zugegeben. Nach zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt mit 16.000 xg bei 4 °C an. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation und Verwerfen des Überstands konnte die DNA in der gewünschten Lösung (z.B. dH₂O) aufgenommen werden.

5.1.7 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese werden lineare DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Dafür wurde ein 1-2 %iges Agarosegel mit der zu untersuchenden DNA-Lösung beladen. Die Fragmentgrößen wurden durch einen Standard mit DNA-Fragmenten definierter Größe bestimmt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes (100 V; 300 mA). Die DNA wurde mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) nachgewiesen.

5.1.8 DNA Konzentrationsbestimmung – photometrisch

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen wurden diese bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch vermessen. Eine Absorption = 1 (Schichtdicke 1 cm) entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA.

5.1.9 Enzymatische Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA mit Typ II Restriktionsendonukleasen ermöglicht das sequenzgenaue Schneiden von DNA-Fragmenten. Beim analytischen Restriktionsverdau dienen die Spaltprodukte zur Überprüfung der eingesetzten DNA, beim präparativen Restriktionsverdau hingegen werden die Spaltprodukte für Klonierungen eingesetzt. Mit bis zu drei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde gleichzeitig DNA (1-5 µg) beim jeweiligen Temperaturoptimum der Enzyme inkubiert. Ein Restriktionsansatz richtete sich nach der Konzentration der eingesetzten DNA und der verwendeten

Enzyme. Nach der Restriktion erfolgte die thermische Inaktivierung der Enzyme und ggf. eine Dephosphorylierung bei Plasmid-DNA.

Tabelle 7: Typische Zusammensetzung einer Restriktion

Komponente	Volumen [μL]
DNA (bspw. 1 μg)	<25
Restriktionsenzym (bspw. <i>NcoI</i>) 10 U/ μL	1
Restriktionsenzym (bspw. <i>NotI</i>) 10 U/ μL	1
10x Reaktionspuffer (bspw. Puffer 3)	3
dH ₂ O	auf 30

5.1.10 DNA-Dephosphorylierung

Die alkalische Phosphatase entfernt endständige 5'-Phosphatgruppen in linearen, doppelsträngigen DNA-Molekülen, um eine Religation linearisierter DNA-Fragmente mit sich selbst zu verhindern. Die linearisierte DNA wurde mit 1 μL *Shrimp alkaline phosphatase* (10 U/ μL ; MBI Fermentas) für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert und anschließend thermisch inaktiviert (65 °C; 15 min). Anschließend wurde die linearisierte, dephosphorylierte DNA gereinigt.

5.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten (*insert*) mit dephosphorylierten DNA-Vektoren erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Die Reaktion wurde bei 16 °C ü.N. durchgeführt. Das erforderliche Verhältnis zwischen Insert und Vektor wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Menge Vektor} [\text{ng}] \cdot \text{Größe Insert} [\text{bp}]}{\text{Größe Vektor} [\text{bp}]} \cdot \text{molares Verhältnis} [\text{bp}] \cdot \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert} [\text{ng}]$$

Tabelle 8: Typische Zusammensetzung einer Ligation

Angegeben sind die Zusammensetzungen für eine normale Klonierung und für die Herstellung einer Antikörpergenbibliothek

Komponente	Normale Klonierung		Erstellung von Genbibliotheken	
	Volumen [μ L]	Menge	Volumen [μ L]	Menge
10x Reaktionspuffer	1	1x	10	1x
T4-DNA-Ligase	0,5	1,5 U	1	3 U
Vektor DNA	1-2	100 ng	10-20	1000 ng
Insert DNA	4-7	~ 200 ng	40-70	~750 ng
dH ₂ O	auf 10		auf 100	

5.1.12 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das *BigDye[®] Terminator Sequencing Kit* (Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1982)) verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde eine Sequenzier-PCR durchgeführt und die DNA wurde anschließend über Ethanol-Präzipitation gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 15 μ L Injektionspuffer aufgenommen und mit dem ABI Genetic Analyzer 310 vermessen. Die Chromatogramme der DNA-Sequenzen wurden mit der Software FinchTV 1.4 ausgewertet.

Tabelle 9: Sequenzier-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil

Komponente	Volumen [μ L]	Temperatur [°C] Zeit t [s]	
DNA- <i>Template</i> (30 ng)	~1	96	60
Reaktionspuffer 5x	2	96	30
Primer (10 pmol/ μ L)	1	50	15
<i>BigDye</i> Reaktionsmix	1	60	240
dH ₂ O	Auf 10		

25x

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Produktion der Proteine Crf2 und Crf2-BAD

Für die Produktion des Crf2-Proteins wurden *E. coli* BLR (DE3) Zellen mit dem Vektor pET21A+Crf2 transformiert. Für die Produktion von *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein wurden die Zellen mit den Vektoren pET21A+Crf2-BAD und pRARE3 (Zoltan Konthur, Max Planck institute

for molecular genetics, Berlin, Germany) kotransformiert [146].

Die Produktion von rekombinantem Crf2-Protein erfolgte in 1.000 mL 2x YT-A Medium und die Produktion von Crf2-BAD-Protein in 1.000 mL 2x YT-A Medium + 50 µm Biotin.

Das Produktionsmedium wurde mit einer 50 mL Übernachtskultur bis zu einer $OD_{600} < 0,1$ beimpft und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die Induktion wurde bei einer $OD_{600} \sim 0,75$ durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und der Ansatz für 5 h bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Nach 20 min Zentrifugation bei 4.200 xg wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 40 mL PBS resuspendiert. Für zweimal 3 min erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall (Sonotrode MS72, Bandelin, Berlin). Nach Zentrifugation für 20 min bei 4.200 xg wurde der zellfreie Überstand mit einem Filter der Porengröße 0,45 µm (Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert und für die Reinigung mittels *ion metal affinity chromatography* (IMAC) verwendet.

5.2.2 Transformation von *E. coli*

Über Elektroporation oder Hitzeschock wurden *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen mit Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen transformiert. Für die Transformation mittels Elektroporation wurde 1 µL Ligationsansatz oder Plasmid-DNA mit 5 µL Zellen und 44 µL dH₂O vermischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen elektrischen Puls von 1,7 kV für ~5 ms. Anschließend wurden 950 µL vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium zu den transformierten Zellen gegeben und für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in SOC-Medium resuspendiert, Aliquots (10 – 100 µL) auf Selektivagarplatten (2x YT-GA) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei der Transformation mittels Hitzeschock wurde der Ligationsansatz oder die Plasmid-DNA mit 50 µL *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen vereint und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 60 sekündigen Hitzeschock bei 42 °C wurde der Transformationsansatz erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 950 µL vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium zu den transformierten Zellen gegeben und für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Wie bei der Elektroporation wurden die Zellen auf Selektivagarplatten ausgesstrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.3 Herstellung der Immunantikörpergenbibliothek MAYKI

Für die Herstellung der anti-Crf2 Antikörpergenbibliothek wurde ein männlicher Makake (*macaca fascicularis*) in zeitlich definierten Abständen viermal mit rekombinanten Crf2-Protein subcutan (s.c.) immunisiert. Die Durchführung erfolgte durch P. Thullier am Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche in, Frankreich gemäß der tierschutzrechtlichen Verordnungen. Nach der Bestimmung des IgG-Antikörper-Titers wurde aus dem Knochenmark die Gesamt-RNA isoliert und daraus die cDNA synthetisiert. Die V_H - und V_L -Antikörpergensequenzen wurden mittels PCR amplifiziert und in einen pGEMT-Vektor kloniert.

Ausgehend von den pGEMT-Vektoren wurden V_H - und V_L -Antikörpergensequenzen mit spezifischen Primern, die die Schnittstellen für die Klonierung in den Phagemid-Vektor enthalten, amplifiziert.

Zunächst wurden die amplifizierten V_H -Antikörpergensequenzen über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* in den Phagemid-Vektor pHAL14 kloniert. Anschließend wurden die amplifizierten V_L -Antikörpergensequenzen über die Schnittstellen *MluI* und *NotI* in den pHAL14 Phagemid-Vektor kloniert. Die Vollständigkeit der Antikörpergenfragmente wurde mittels Kolonie-PCR und einer gelelektrophoretischen Größenauftrennung im Agarosegel überprüft.

5.2.4 Infektion von *E. coli* und Produktion von M13K07-Antikörperphagen

Das "Verpacken" der Antikörpergenbibliothek zu Antikörperphagen wurde mit den Phagemiden transformierten *E. coli*-Zellen durchgeführt, indem diese mit M13-Phagen infiziert wurden. Hierzu wurde zunächst eine *E. coli*-Flüssigkultur erstellt und im Schüttelkolben bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ ($= 5 \cdot 10^8$ cfu) kultiviert. Von dieser wurden anschließend 20 mL ($= 2 \cdot 10^{10}$ cfu) abgenommen und mit einem 20-fachen Überschuß an M13K07 Helferphagen ($= 2 \cdot 10^{11}$ cfu) für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und danach für weitere 30 min bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach einer Zentrifugation von 5 min bei 3.220 xg geerntet und in 1 mL 2x YT-AK Medium resuspendiert. Für die Produktion der Antikörperphagen wurden 250 mL 2x YT-AK Medium mit der Zellsuspension inokuliert und ü.N. bei 30 °C und 250 rpm kultiviert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10.000 xg enthielt der zellfreie Überstand die Antikörperphagen. Diese wurden durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl und Inkubation für 1 h auf Eis gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (1 h; 4 °C; 10.000 xg) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL PDB gelöst. Durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl und Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte eine zweite Fällung der Antikörperphagen. Nach Zentrifugation (30 min; 4 °C; 3.220 xg) wurde das Zellpellet in 1 mL PDB

gelöst. Zur Abtrennung noch enthaltener Zellreste wurde die Phagensuspension für 10 min bei 16.000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein 2 mL Schraubröhrchen überführt.

5.2.5 Titerbestimmung von M13-Antikörperphagen

Der Titer der produzierten Antikörperphagen wurde mit der *cfu*-Methode bestimmt. Die Zahl infektiöser Partikel wurde durch die Infektion von untransformierten *E. coli* XL1-Blue MRF' und die anschließende Kultivierung dieser Zellen auf Selektivagarplatten ermittelt. Zunächst wurde eine 2x YT-T Flüssigkultur mit den *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen erstellt und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ inkubiert. Parallel wurde aus der Phagensuspension eine Verdünnungsreihe in PBS erstellt. Anschließend wurden 50 µL *E. coli*-Flüssigkultur mit 10 µL der jeweiligen Verdünnungsstufe gemischt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf 2x YT-GA Selektivagarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C ü.N. wurden die gewachsenen Kolonien (*cfu*) aus der bekannten Verdünnungsstufe der Phagensuspension ausgezählt und der entsprechende Phagen-Titer berechnet.

5.2.6 Selektion mit Antikörperphagenbibliotheken

5.2.6.1 Antikörperselektion in Mikrotiterplatten

Für die Antikörperselektion in Mikrotiterplatten wurde das Antigen Crf2 direkt auf der reaktiven Kunststoffoberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. In der ersten und der zweiten Runde wurden 100 ng/*well* und in der dritten 10 ng/*well* rekombinantes Crf2 Protein in 100 µL PBS ü.N. immobilisiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T wurden die reaktiven Oberflächen mit 2 % MPBS-T abgesättigt. Parallel wurde die Antikörperphagenbibliothek zur Abreicherung von BSA- und Milchpulver-Bindern in dem *panning-block*-Puffer (MPBS-T + 2 % BSA) präinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Antikörperphagenbibliothek mit dem Antigen für 2 h bei RT. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T (Programm "10BONS2") im ELISA-washer wurden die Phagen mit 200 µg/mL Trypsin für 30 min bei 37 °C eluiert. Für die Titerbestimmung wurden 10 µL Phageneluat der Antikörperphagen verwendet (siehe 5.3.4). Mit den anderen 190 µL des Phageneluats wurden anschließend 20 mL einer *E. coli*-Flüssigkultur bei einer $OD_{600} \approx 0,5$ infiziert und für 30 min

bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 3220 xg wurde das Pellet in 250 µL YT-GA Medium resuspendiert und auf 2x YT-GA Selektivagarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation ü.N. bei 37 °C wurden die Agarplatten mit 5 mL 2x YT-GA Medium abgeschwemmt. Aus dieser Bakteriensuspension wurde zum Einen ein Glycerinstock angelegt und zum Anderen wurden neue Phagen für die nächste Selektionsrunde amplifiziert. Die Durchführung der nächsten Selektionsrunden war bis auf die eingesetzte Antigenkonzentration und die Anzahl der Waschschrte identisch.

5.2.6.2 Antikörperselektion in Lösung

Zunächst wurden für jede Antikörperselektion 5 µL magnetische Streptavidin-*beads* (Dynabeads, M280) in 1 mL MPBS-T inkubiert. Die *beads* wurden magnetisch fixiert (Dyna MPC) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden sie mit $1 \cdot 10^{11}$ cfu der jeweiligen Antikörperphagenbibliothek inkubiert. Dieser Schritt diente zur Abreicherung von Antikörperphagen, die unspezifisch Streptavidin-*beads* binden. Der Überstand wurde dann für die Antikörperselektion mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein verwendet. In der ersten und zweiten Selektionsrunde wurden jeweils 100 ng und in der dritten Runde 50 ng Crf2-BAD-Protein verwendet. Nach einer Inkubation für 2 h bei RT erfolgte für 20 min ein *pull-down* mit 5 µL magnetischen Streptavidin-*beads*. Danach wurden die *beads* mit dem gebundenen Crf2-BAD-Protein magnetisch abgetrennt und der Überstand verworfen. Um nicht spezifisch bindende Antikörper-Phagen zu entfernen, wurden die *beads* 20 x mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die an die *beads* gebundenen Antikörperphagen mit 200 µL Trypsin (10 µg/mL) eluiert. Die *beads* wurden verworfen und der Überstand wurde für die Titerbestimmung und die Amplifikation der Antikörperphagen verwendet. Die weiteren Selektionsrunden verliefen identisch, bis auf Änderungen der verwendeten Antigenkonzentration und Anzahl der Waschschrte.

5.2.7 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen und -kulturen wurden 800 µL einer ü.N. Flüssigkultur mit 200 µL 87 % (v/v) Glycerin versetzt und in ein 2 mL Mikroschraubröhrchen gegeben. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Kulturen bei -80 °C gelagert.

5.2.8 Produktion von löslichen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten

Für die erste Überprüfung selektierter scFvs im monoklonalen-ELISA wurden lösliche scFvs in Mikrotiterplatten produziert. Bei dieser Produktion im Kleinmaßstab lagen die Antikörpergensequenzen noch im Phagemid-Vektor pHAL14 vor. Von den Selektivagarplatten der jeweiligen Panningrunden wurden steril Einzelkolonien entnommen und Polypropylen (PP) Mikrotiterplatten mit 150 µL 2x YT-GA Medium je *well* wurden mit einer Einzelkolonie beimpft. Die MTP wurden mit einem Polystyrol (PS) Deckel verschlossen und bei 37 °C und 1.200 rpm ü.N. inkubiert. Mit 10 µL jeder Einzelkultur wurden 150 µl 2x TY-A einer neuen PP-MTP beimpft und für 2 h bei 37 °C und 1.000 rpm inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 3.220 xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2x YT-A + 50 µM IPTG resuspendiert. Die Produktion löslicher scFvs erfolgte ü.N. bei 30 °C und 1.000 rpm. Nach 30 min Zentrifugation wurde der lösliche Überstand mit den produzierten scFvs abgenommen und für weitere Versuche verwendet.

5.2.9 Produktion von scFv-Fragmenten im Schüttelkolben

Die Produktion größerer Mengen an scFv-Fragmenten in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen erfolgte mit dem prokaryotischen Expressionsvektor pOPE101-Express.

Für die Produktion wurden 300 mL 2x TY-A Medium mit einer Vorkultur bis zu einer OD₆₀₀ <0,15 beimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zur OD₆₀₀ ≈0,7 inkubiert. Ab OD₆₀₀ ≈0,7 wurde mit 50 µM IPTG die Antikörperexpression induziert. Die Produktion erfolgte für 3 h bei 30 °C und 200 rpm. Anschließend wurde für 30 min bei 4.200 x g zentrifugiert. Zur Gewinnung der produzierten scFvs wurde mit dem Zellpellet die periplasmatische Zellpräparation, und mit dem Überstand eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt.

5.2.10 Kultivierung von *Aspergillus spp.* und *Candida albicans*

Die Pilze wurden zunächst in 50 mL Erlenmeyerkolben in 25 mL *Complete*-Medium bei 37 °C für 72 h und 100 rpm kultiviert. Anschließend wurde der Kulturüberstand auf jeweilige Festmedien in Zellkultur-Flachbodenflaschen übertragen. Die Schimmelpilze *Aspergillus fumigatus* (Klinisches Isolat D141) (Staib *et al.* 1980) und *A. flavus* (DSM818, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany) wurden gemäß DSM bei 27 °C auf Kartoffel-Stärke-Agar kultiviert. Die Pilze *A. terreus* (DSM1958) und *A. nidulans* (*Emericella nidulans*, DSM970) wurden

auf Kartoffel-Stärke-Agar bei 37 °C kultiviert. Die Kultivierung des Schimmelpilzes *A. clavatus* erfolgte auf Czapek-Dox-Agar bei 27 °C und die des Hefepilzes *Candida albicans* auf Universal-Medium für Hefen bei 27 °C. Zur Ernte der Sporen wurden 20 mL dH₂O auf das Medium gegeben und die Sporen gelöst. Die Sporenlösung wurde anschließend durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert und bei 3200 xg für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL dH₂O resuspendiert und die Sporenkonzentration mittels Thoma-Kammer bestimmt.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde in 96 well Mikrotiterplatten (Maxisorp oder Streptavidin F96 clear, nunc). Die Immobilisierung des rekombinanten Crf2-Proteins erfolgte in 100 µL PBS/well bei 4 °C über Nacht. Das *in vivo* biotinylierte Crf2-BAD-Protein wurde in der gleichen Konzentration hingegen für 20 min bei RT auf Streptavidin-Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Antigenlösung in den wells wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt und die reaktiven Oberflächen für 1,5 h bei RT mit 2 % MPBS-T geblockt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST wurden scFvs oder Serumantikörper in 100 µL MPBS-T gelöst und für 1 h bei RT mit dem Antigen inkubiert. Nach dem Waschen wurden die spezifisch bindenden scFvs mit Maus-anti-c-myc IgG 9E10 (1:500 in MPBS-T verdünnt) inkubiert und erneut gewaschen. Die spezifisch bindenden Serumantikörper oder scFvs wurden mit dem Nachweisantikörper Ziege-anti-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10000 in MPBS-T verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Mikrotiterplatten wurden 100 µL/well Substratlösung TMB (TMB-A + TMB-B; Verhältnis 19:1) hinzugefügt. Die Färbereaktion erfolgte für 5-20 min und wurde durch Zugabe von 100 µL 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Durch die Säurezugabe erfolgte ein Farbumschlag von Blau nach Gelb. Die Absorption bei $\lambda = 450$ nm (Referenzmessung bei $\lambda = 620$ nm) wurde anschließend je well im Tecan Sunrise ermittelt.

5.3.2 *Capture-ELISA*

Für den *capture-ELISA* wurden 400 ng/*well* scFvs in 100 µL PBS bei 4 °C ü.N. in Mikrotiterplatten (Maxisorp, nunc) immobilisiert. Nach dem Waschen und Blocken der reaktiven Oberflächen mit 350 µL 2 % MPBS wurde mit einer Verdünnungsreihe von 0,1-600 ng/mL *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein (in 2 % MPBS-T gelöst) für 1,5 h bei RT inkubiert. Der Nachweis des spezifisch gebundenen biotinylierten Crf2-BAD-Proteins erfolgte durch die Inkubation für 1 h mit 100 µL Streptavidin HRP-Konjugat (1 µg/mL in 2 % MPBST gelöst). Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBST im ELISA-*washer*. Die Färbereaktion und die Absorptionsbestimmung erfolgte gemäß der Durchführung *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Als Nachweisgrenze in ng/mL wurde die höchste Verdünnungsstufe bei einem ELISA-Signal, das noch fünffach über der Negativkontrolle lag, definiert.

5.3.3 *Bridging-ELISA*

Für den *Bridging-ELISA* wurde 100 ng/*well* rekombinantes Crf2-Protein in 100 µL PBS bei 4 °C ü.N. in Mikrotiterplatten (Maxisorp, nunc) immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die reaktiven Oberflächen für 1,5 h bei RT mit 350 µL 2 % MPBS geblockt. Das Protein wurde anschließend mit 100 µL Serumantikörper (1:400 in 2 % MPBS gelöst) für 1 h inkubiert. Daraufgehend wurde mit 100 ng/*well* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein (in 2 % MPBS gelöst) für 1 h inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit 100 µL Streptavidin HRP-Konjugat (1 µg/mL in 2 % MPBS gelöst) für 1 h. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS-T im ELISA-*washer*. Die Färbereaktion und die Absorptionsbestimmung erfolgte gemäß der Durchführung *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Der Nachweis der Serum-Antikörper erfolgte indirekt über die spezifische Bindung an das biotinylierte Crf2-BAD-Protein und dessen Nachweis mittels Streptavidin-HRP.

5.3.4 Titerbestimmung von Serum-Antikörpern im ELISA

Für die Titerbestimmung von Serumantikörpern wurden zunächst 200 ng/*well* rekombinantes Crf2-Protein in 100 µL PBS bei 4 °C ü.N. in Mikrotiterplatten (Maxisorp, nunc) immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T und Blocken der reaktiven Oberflächen mit 350 µL 2 % MPBS

wurde eine Verdünnungsreihe des Serums von 1:4.000 bis 1:512.000 für 1 h inkubiert. Anschließend wurde mit 100 µL Ziege-anti-Maus-IgG (Fc-spez.) HRP-Konjugat (1:20.000 in 2 % MPBS gelöst) für 1 h inkubiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS-T im ELISA-washer. Die Färbereaktion und die Absorptionsbestimmung erfolgte gemäß der Durchführung *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Als Antikörper-Titer wurde die höchste Verdünnungsstufe definiert, deren Absorptionswert noch fünffach über dem der Negativkontrolle lag.

5.3.5 ScFv Stabilitätsanalyse

Die verwendeten scFvs wurden als Triplikate zu je 100 µL Aliquots (5 µg/mL scFv-Protein) in 2 mL Mikro-Schraubröhren (Sarstedt, Nürnberg) bei -80 °C gelagert. Nach einem definierten Zeitschema wurden diese Proben entnommen und bei 37 °C inkubiert (vgl. Abbildung 35).

Für den Antigen-ELISA wurde biotinyliertes Crf2-BAD-Protein auf Streptavidin-Mikrotiterplatten (nunc) immobilisiert und der ELISA wurde mit 80 µL scFv-Lösung (4 µg/mL scFv-Protein) durchgeführt. Die Durchführung des scFv-Stabilitäts-ELISA erfolgte gemäß dem Antigen-ELISA.

5.3.6 SDS-PAGE

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Proteinuntereinheiten wurde die diskontinuierliche Proteingelelektrophorese mit Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Zusammensetzung eines 12 %igen Trenn- und eines 4 %igen Sammelgels ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad Mini-Protean) wurde das Trenngel gegossen und auspolymerisiert.

Anschließend wurde über das Trenngel das Sammelgel gegossen und der entsprechende Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt und diese mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Taschen des SDS-PAA-Gels mit den Proben und einem Proteinmarker (molarer Massenstandard) beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA und 300 V für ≈50 min.

Tabelle 10: Zusammensetzung SDS-PAA-Proteingele

Angegeben sind die eingesetzten Mengen für die Herstellung von einem 12 %igen Trenn- und einem 4 %igen Sammelgel.

Komponente	Volumen [μ L]	
	Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	1300	1000
30 % Acrylamid mix	1600	260
1,5 M TrisHCl pH 8,8	1000	-
1 M TrisHCl pH 6,8	-	200
10 % SDS	40	15
10 % APS	40	15
TEMED	2	2

5.3.7 Coomassiefärbung von Proteingelen

Für die Coomassiefärbung wurden nach beendeter Proteingelelektrophorese die Gele in ~20 mL Coomassie-Färbelösung gelegt, für \approx 1 min in der Mikrowelle erwärmt und weitere 2 min gefärbt. Nach Wechsel der Färbelösung wurden die Gele mit der Entfärbelösung für \approx 1 min in der Mikrowelle erwärmt und 20 min entfärbt. Die weitere Lagerung der Gele erfolgte in dH₂O.

5.3.8 Quantifizierung von Proteinmengen

Die Quantifizierung von Proteinmengen erfolgte densitometrisch über die Farbintensität Coomassie-gefärbter SDS-Polyacrylamidgele und der Software image J (V1.37). Das Prinzip der densitometrischen Konzentrationsbestimmung beruht darauf, dass die Bandenintensität Coomassie-gefärbter Proteinbanden in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear verläuft.

Zunächst wurde die zu bestimmende Proteinprobe zusammen mit einem definierten Standard in der SDS-PAGE aufgetrennt und gefärbt. Nach dem Einscannen des Gels wurden die konzentrations-abhängigen Farbintensitäten des Standards in einem Histogrammplot ermittelt. Aus den resultierenden Peakflächen des Standards wurde eine Gleichung aus der linearen Regressionsgeraden berechnet. Die Konzentration des zu quantifizierenden Proteins wurde aus seiner Peakfläche im Histogramm und der Geradengleichung des Standards berechnet. Als Protein-Standard wurde der scFv TM44-C.7 verwendet.

5.3.9 Western Blot

Die mittels Western Blot im *semi dry* Verfahren aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurden auf eine PVDF Membran transferiert. Das mit Laufpuffer getränkte Filterpapier (Schleicher & Schüll) wurde direkt auf die Elektrodenplatte gelegt und darüber die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran. Das Polyacrylamidgel wurde zwischen PVDF-Membran und ein getränktes Filterpapier gelegt, welches mit einer zweiten Elektrodenplatte bedeckt wurde. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (20 V; 330 mA; 45 min) wurden die Proteine aus dem Gel orthogonal auf die PVDF-Membran übertragen.

5.3.10 Immunfärbung

Die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden mittels Immunfärbung nachgewiesen. Vor der Färbung wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindestellen für 30 min in 2 % MPBS-T inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit einem proteinspezifischen Antikörper in 2 % MPBS-T für 1 h bei RT.

Die produzierten Antigene Crf2 und Crf2-BAD oder produzierte scFvs wurden mit einem Maus-anti-Penta-His für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Zweitantikörper mit einem Ziege-anti-Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:2.000, in 2 % MPBS-T gelöst) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T wurde die Membran zusätzlich zweimal mit Substratpuffer gewaschen. Es folgte die Immunfärbung durch Inkubation der Membran in Substratlösung (NBT/BCIP, je 1:100 in Substratpuffer). Die Färbereaktion wurde durch das Waschen der Membran mit dH₂O gestoppt.

Um die Bindung von scFv-Proteinen oder Serumantikörpern an ihr Antigen nachzuweisen, wurden die scFvs in entsprechender Konzentration oder die Seren in entsprechender Verdünnung in 2 % MPBS-T gelöst und für 1 h bei RT inkubiert. Bei zuvoriger Inkubation der scFvs erfolgte nach dreimaligem Waschen ein weiterer Inkubationsschritt mit dem Maus-anti-c-myc-IgG 9E10 (1:500, in 2 % M-PBST gelöst). Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die scFvs oder die Serumantikörper mit Ziege-anti-Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:2.000, in 2 % MPBS-T gelöst) inkubiert. Die weitere Nachweisreaktion erfolgte wie bei der Immunfärbung zum Nachweis produzierter Proteine.

5.3.11 Epitop-Kartierung

Die Epitop-Kartierung erfolgte auf Celluloseacetatmembranen (Dr. Ronald Frank, Abteilung Chemische Biologie, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung). Die gesamte Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine war durch mehrere 15-mer Peptidspotsequenzen mit einem 6-er *overlap* auf den Membranen aufgebracht. Die Membranen wurden nach Absättigung für 1 h bei RT mit 2 % MPBS mit den Mausseren oder mit scFv-Fc-Fusionsproteinen für 1 h bei RT inkubiert. Die Mausseren wurden 1:400 in 2 % MPBS verdünnt und die scFv-Fc-Fusionsproteine in der Konzentration 4 µg/mL (in 2 % MPBS gelöst) verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Mausseren mit Ziege-anti-Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:2.000, in 2 % MPBS gelöst) und die humanen scFv Fc-Fusionsproteine mit Ziege-anti-Mensch-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:5.000, in 2 % MPBS gelöst) nachgewiesen. Vor der Entwicklung wurde jeweils 1x mit TBS-T und CBS gewaschen. Als Substrat diente MTT/BCIP (100 µL 1 M MgCl₂ + 80 µL BCIP + 120 µL MTT in 20 mL CBS). Die Entwicklung der Färbung dauerte 30 min bis 24 h. Anschließend wurden die Peptidmembranen eingescannt und für weitere Färbungen regeneriert. Waschschritte (20 mL, je 10 min): 2x DMF, 2x dH₂O; 2x Stripping-Puffer A; 2x dH₂O; 2x Stripping-Puffer B; 2x 100 % Ethanol. Die Lagerung der Membran erfolgte bei -20 °C.

5.3.12 Periplasma-Präparation (PPP) von *E. coli*-Zellen

Nach beendeter Produktion der Antikörperfragmente in *E. coli*-Zellen wurde die Flüssigkultur für 20 min und 4.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1/10 Volumen (bezogen auf das Kulturvolumen) kaltem Schockpuffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation für 30 min bei 20.000 xg wurde der Überstand ü.N. bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

5.3.13 Ammoniumsulfatfällung (ASF) vom Kulturüberstand

Zum Kulturüberstand der zentrifugierten Antikörperfragmentproduktion wurde zur Fällung dieser 40 % (w/Kulturvolumen) Ammoniumsulfat gegeben, für mindestens 20 min in einem Überkopfschüttler gelöst und anschließend bei 8.300 xg bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen (bezogen auf das Kulturvolumen) PBS resuspendiert und bei 4 °C ü.N. gegen PBS dialysiert.

5.3.14 Affinitätschromatographie

5.3.14.1 IMAC-Reinigung von scFv-Fragmenten im *batch*-Verfahren

Für die IMAC-Reinigung wurden die dialysierten ASF- und PPP-Fractionen zuvor vereint und auf eine Konzentration von 0,5 M NaCl und 10 mM Imidazol eingestellt. Die ASF- und PPP-Fractionen wurden für 1 h mit 1 mL *Chelating Sepharose FF* (mit Ni^{2+} beladen) bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde per Zentrifugation (500 xg; 5 min) abgetrennt und mit 4 mL IMAC-Waschpuffer 1 für 5 min inkubiert. Nach erneuter Matrixabtrennung wurde mit 4 mL IMAC-Waschpuffer 2 gewaschen. Nach der Äquilibration der Matrix mit PBS wurden die gebundenen scFv-Fragmente durch Inkubation der Matrix mit 2 mL IMAC-Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden fraktioniert und nach der Analyse mittels SDS-PAGE bei -80 °C gelagert.

5.3.14.2 Reinigung von Crf2 und Crf2-BAD-Protein mittels IMAC-Säulenchromatographie

Die Durchführung der IMAC-Reinigung mit der Äkta prime™ und der Chromatographie-Säule „HisTrap crude FF“ erfolgte gemäß der Herstellervorgabe. Die Flussrate betrug während des Probenauftrags, des Waschens und der Elution stets 1 mL/min. Vor der Elution wurde die Säule mit IMAC-Waschpuffer solange gewaschen, bis ein konstanter Leitfähigkeitswert zu messen war. Die fraktionierte Elution des gebundenen Crf2-Proteins oder des Crf2-BAD Proteins erfolgte mit IMAC-Elutionspuffer im Gradienten von 0-100 %. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert und für die Dialyse vereinigt. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C ü.N. gegen 20 mM Tris HCl mit einem pH von 8,0. Der pI der Proteine Crf2 und Crf2-BAD lag bei 4,56, so dass nach Dialyse zur weiteren Reinigung eine Anionenaustauscher-Chromatographie durchgeführt werden konnte.

5.3.14.3 Reinigung von Crf2- und Crf2-BAD-Protein mittels IEC-Säulenchromatographie

Die Durchführung der IEC-Reinigung mit der Äkta prime™ und der Chromatographie-Säule „Resource Q“ erfolgte gemäß der Herstellervorgabe. Zuvor wurden die Probe aus der IMAC-Reinigung zentrifugiert (5 min; 3.220 xg) und der zellfreie Überstand sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße). Die Flussrate betrug während des Probenaufrags, des Waschens und der Elution stets 1 mL/min. Nach Probenaufrag wurde die Anionenaustauscher-Säule solange mit IEC-Waschpuffer gewaschen, bis ein konstanter Leitfähigkeitswert zu messen war. Die fraktionierte Elution des gebundenen Crf2- oder Crf2-BAD-Proteins erfolgte mit IEC-Elutionspuffer im Gradienten von 0-100 %. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert und für die Dialyse ggf. vereinigt. Die Dialyse der gereinigten Proteine Crf2 oder Crf2-BAD erfolgte bei 4 °C ü.N. gegen PBS. Nach der Analyse mittels SDS-PAGE, Western Blot und der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine bei -80 °C gelagert.

5.3.14.4 Reinigung der scFv Fc-Fusionsproteine mittels Protein A-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der scFv Fc-Fusionsproteine mittels Äkta prime™ und der Protein A Affinitätschromatographiesäule „Mab select“ erfolgte gemäß der Herstellervorgabe. Das Zellkulturmedium mit den enthaltenen scFv-Fc-Fusionsproteinen wurde zunächst zentrifugiert (10 min; 3.220 xg) und der zellfreie Überstand sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße). Die Flussrate während des Probenaufrags, des Waschens und der Elution betrug stets 1 mL/min. Nach Auftragen der Probe wurde mit Protein A-Waschpuffer gewaschen bis ein konstanter Leitfähigkeitswert zu messen war. Die Elution mit Protein A-Elutionspuffer erfolgte durch Änderung des pH-Wertes. Die Elutionsfraktionen wurden zur pH-Neutralisierung in Tris HCl pH 9,0 aufgenommen und bei 4 °C ü.N. gegen PBS dialysiert. Nach Analyse mittels SDS-PAGE, Western Blot und der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine bei 4 °C gelagert.

5.4 Zellbiologische Methoden

5.4.1 Transfektion der HEK293T-Zellen

Die Produktion der scFv Fc-Fusionsproteine erfolgte in HEK293T-Zellen. Diese wurden mit einem pCMV-hIgG1-Fc-XP Vektor transfiziert, in den zuvor ausgewählte anti-Crf2 scFv-Gensequenzen kloniert wurden. Die Transfektion erfolgte mit dem kationischen Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI). Dazu wurden pro Transfektionsansatz 10 µg Vektor-DNA mit 40 µL PEI (1 µg/mL), jeweils in 250 µL DMEM-Medium gelöst, vereint und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transfektionsansatz auf die HEK293T-Zellen gegeben und gleichmäßig verteilt.

5.4.2 Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen

Für eine bessere Adhäsion der Zellen an die Plattenoberfläche wurden diese mit Poly-L-Lysin vorbehandelt. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen derart vereinzelt, dass die Platten am Transfektionstag maximal zu 70 % bewachsen waren.

Nach der Transfektion erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 7 % CO₂-Begasung zunächst für 24 h in DMEM-Medium mit 8 % (v/v) FCS. Danach wurde zu DMEM-Medium mit 4 % (v/v) FCS (low IgG) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin gewechselt. Dieses wurde täglich erneuert, wobei das abgenommene Medium mit den produzierten scFv-Fc-Fusionsproteinen bis zur Reinigung bei 4 °C gelagert wurde.

5.5 Biophysikalische Methoden

5.5.1 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Für die Bestimmung der Bindungsparameter der scFvs wurde das rekombinante Crf2-Protein und BSA (Bovines Serumalbumin) als Negativkontrolle gemäß der Herstellerempfehlung über eine Aminbindung an den CM5-Messchip gekoppelt (*BIAapplications Handbook*). Die Chipoberfläche wurde zweistufig zunächst mit NHS und dann mit EDC aktiviert. Das rekombinante Crf2-Protein (10 µg/mL) wurde in 10 mM Acetatpuffer pH 4,0 und das BSA (10 µg/mL) in 10 mM Acetatpuffer pH 4,5 mit je 200 RU gekoppelt. Die verbliebenen reaktiven Gruppen wurden mit einer Ethanolamin-

Hydrochlorid-Lösung pH 8,5 abgesättigt. Alle kinetischen Messungen zur Bestimmung der Bindungseigenschaften wurden mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Die Assoziationsphase betrug jeweils 300 s, die Dissoziationsphase 600 s. Die Messungen wurden gemäß den Angaben im *BIAevaluation Handbook* ausgewertet. Mögliche Änderungen sind direkt im Ergebnisteil angegeben.

5.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit *Aspergillus spp.* oder *Candida albicans* wurden 4,5 mL RPMI 1640 (PAA) Medium mit $\approx 5 \cdot 10^4$ Sporen inokuliert. Die Sporenlösung wurde in 12 *well* Platten auf Poly L-Lysin beschichteten Deckgläschen für 24 h und 37 °C kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit 250 μL Blockinglösung (3% (w/v) BSA, 2% (w/v) Milchpulver, 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) für 1,5 h geblockt. Mit 250 μL scFv-Fc-Fusionsprotein (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Blocklösung) wurden die kultivierten Pilze inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Die gebundenen scFv-Fc-Fusionsproteine wurden mit 250 μL Ziege-anti-Mensch-IgG (Fc spez.) Alexa488-Konjugat für 1,5 h unter Lichtausschluß inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dH_2O wurden die Pilze auf einem Objektträger mit 10 μL Mowiol fixiert und über Nacht unter Lichtausschluß getrocknet. Als Mikroskop wurde das Zeiss Axiovert 200 mit dem Fluoreszenzfiltersatz F41-001 (Anregung 480/40 nm, Emission 535/550 nm) verwendet.

Die Aufnahmen wurden mit 63-facher Vergrößerung, einem Verstärkungsgrad (*gain*) von 75 und einer Belichtung (*exposure*) von 1,2 für die FITC- bzw. einer Belichtung von 0,001 für die Hellfeld-Mikroskopie durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der Software LSM image browser (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und der Software image J ausgewertet.

5.6 Tierversuche

Die Immunisierung des männlichen Makaken mit rekombinantem Crf2-Protein, zur Herstellung einer Immunantikörpergenbibliothek erfolgte durch P. Thullier, am Centre de Recherche du Service de Santé des Armées La Tronche, in Frankreich. Die Immunisierung und die Entnahme des Knochenmarks erfolgte unter den in Frankreich gültigen ethischen Grundsätzen, Richtlinien und Standards für

Tierversuche.

Die aktive Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit rekombinantem Crf2-Protein, sowie die intranasale Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* und die anschließende Blutentnahme aus den Mäusen erfolgte durch Mike Hasenberg an der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg . Die Durchführung der Versuche an den Mäusen entsprach den in Deutschland gültigen ethischen Grundsätzen, Richtlinien und Standards für Tierversuche.

6 Ergebnisse

6.1 Isolierung der cDNA der Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 von *Aspergillus fumigatus*

Ein geeignetes Antigen für den Nachweis der Invasiven Aspergillose (IA), das sich zugleich als therapeutisches *Target* für die Behandlung eignet, ist für *A. fumigatus* spezifisch, zellassoziiert und im Serum detektierbar. Diese Anforderungen werden von den Glykosylhydrolasen Asp f9, Asp f16 und Crf1 erfüllt. Sie sind einerseits über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellwand des Pilzes verankert, werden aber auch ins umgebende Milieu abgegeben [110,58,111,112,74]. Zudem sind sie immunogen und lösen neben einer T_H1- auch eine spezifische B-Zellantwort aus [110,58-60]. Diese Antigene sollten daher für die Generierung rekombinanter Antikörper zur Diagnostik und Therapie der IA isoliert werden.

Für die Isolierung der cDNA-Sequenzen von *asp f9*, *asp f16* und *crf1* stand als Ausgangsmaterial die mRNA aus Patientenmaterial mit einer manifestierten IA zur Verfügung. Zunächst wurde die Gesamt-cDNA synthetisiert und anschließend mittels spezifischer Primerpaare durch *nested*-PCR die cDNA-Sequenzen von *asp f9*, *asp f16* und *crf1* isoliert. In Tabelle 11 sind die verwendeten Primer, die Zyklenzahl sowie die erwarteten und tatsächlich amplifizierten Gen-Fragmentgrößen zusammengefasst.

Tabelle 11: Isolierung von *asp f9* und *asp f16/crf* mittels *nested*-PCR.

Zusammenfassung der verwendeten Primer, der Zyklenzahl sowie der erwarteten und tatsächlich amplifizierten Gen-Fragmentlänge für die jeweilig zu isolierenden cDNAs von *asp f9*, *asp f16* und *crf1*.

<i>nested</i> -PCR	Gen	Primer	Zyklen	Erwartete Nukleotidlänge [bp]	Amplifizierte Nukleotidlänge [bp]
1. PCR	<i>asp f9</i> , <i>asp f16/crf1</i>	5'-MK-AF-Crf1-f1/ 3'-MK-AF-Crf1-r1	30	1212	/
	<i>asp f9</i>	5'-MS_Asp_f16_NheI/ 3'-MS_Aspf9_r_NotI	30	828	828
2. PCR	<i>asp f16</i>	5'-MS_Asp_f16_NheI/ 3'-MS_Crf_r_NotI	30	1134	948
	<i>crf1</i>	5'-MS_Asp_f16_NheI/ 3'-MS_Crf_r_NotI	30	1134	948

Es wurden zwei PCR-Produkte von 828 und 948 bp isoliert (Abbildung 13), wobei die erwartete

Nukleotidlänge der cDNA-Fragmente von *asp f16* 1134 bp, von *crf1* 1134 bp und von *asp f9* 828 bp betragen sollte.

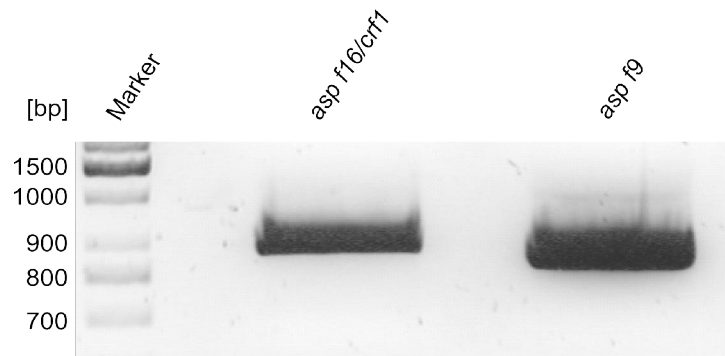


Abbildung 13: Isolierung der cDNA-Sequenzen von *asp f16/crf1* und *asp f9*

Elektrophoretische Größenauftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5 %igem Agarosegel. Die resultierende DNA-Bande für das PCR-Produkt von *asp f16/crf1* hatte eine Größe von 948 bp und für das PCR-Produkt von *asp f9* 828 bp.

Die PCR-Fragmente wurden über *NheI* und *NotI* in die prokaryotischen Expressionsvektoren pET21A+ und pET21A+BAD kloniert und anschließend sequenziert. In mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Bedingungen konnte weder die vollständige Gensequenz von *asp f16*, noch von *crf1* isoliert werden. Im Gegensatz dazu wurde neben der Sequenz von *asp f9* eine neue Variante isoliert, die wegen ihrer Sequenzhomologie zu *crf1* als *crf2* bezeichnet wurde.

Nach Translation wurden die Aminosäuresequenzen der Transkripte mit den Sequenzen der Proteine Asp f9, Asp f16 und Crf1 in einem multiplen Sequenz-*Alignment* verglichen (Abbildung 14). Die Aminosäuresequenz des Crf2-Proteins entsprach von Position 1→310 und von 405→411 der Sequenz des Crf1-Proteins, wobei die Aminosäuren zwischen Position 311→404 beim Crf2-Protein fehlen. Des Weiteren wurde an Position 210 des Proteins Crf2 ein Aminosäureaustausch identifiziert (D→G), welcher bei den Proteinen Asp f9, Asp f16 und Crf1 nicht vorhanden war. Die Sequenz des *asp f9* cDNA-Fragments wurde bestätigt, mit der Einschränkung, dass sich bei der isolierten Variante an Position 218 ein Aminosäureaustausch (V→M) befand (Abbildung 14). Dieser Austausch wurde bisher nicht für die Proteine Asp f9, Asp f16 und Crf1 in den Datenbanken beschrieben. Darüber hinaus war dieser Aminosäureaustausch auch nicht in der parallel aus demselben Patientenmaterial isolierten Crf2-Protein, obwohl die Proteine Crf2 und Asp f9 von demselben *crf1*-Gen kodiert werden. Aus dem Pilzisolat des Patienten wurden die cDNA-Sequenzen für *asp f9* und das neue Transkript *crf2* isoliert, während die cDNA-Sequenzen von *asp f16* und *crf1* nicht isoliert werden konnten. Die cDNA-Sequenzen von *asp f9* und *crf2* weisen in einem gemeinsamen Genabschnitt jeweils mehrere

Punktmutationen auf.

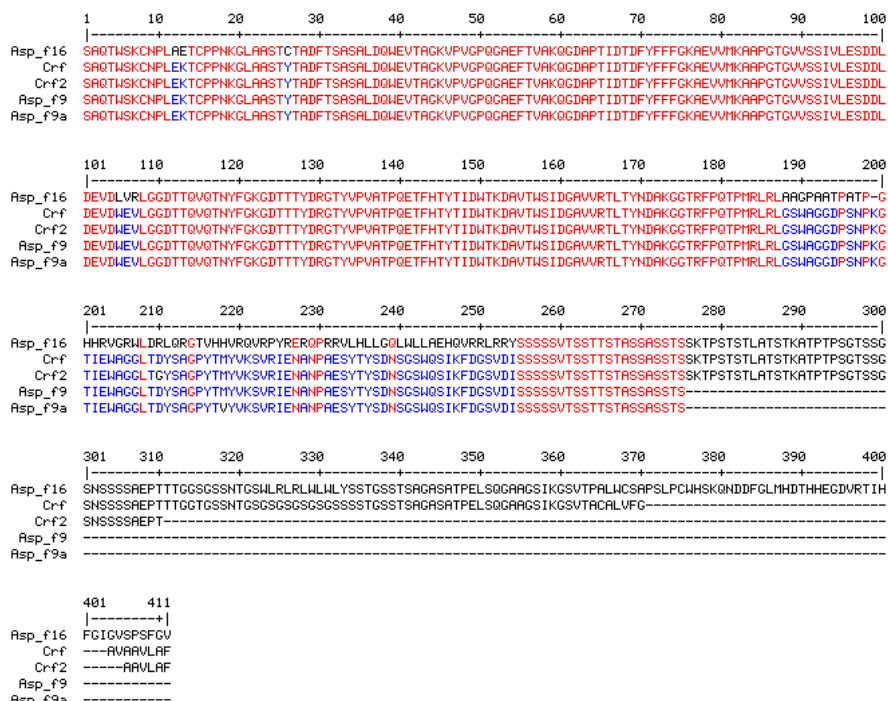


Abbildung 14: Multiples Sequenz-Alignment der Aminosäuren von Asp f16, Crf, Crf2, Asp f9 und Asp f9a

Multiples Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen der Proteine Asp f16 (accession no. AAC61261), Crf1 (XP_752985), Asp f9 (CAA11266) und der *in silico* translatierten Genisolate Crf2 und Asp f9a. Beim Protein Crf2 befindet sich an Position 210 der Aminosäuresequenz ein Glycin statt eines Aspartats und beim Protein Asp f9a befindet sich an Position 218 ein Valin statt eines Methionins. Das multiple Sequenz-Alignment wurde mit der Software „MultAlin“ (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/-multalin.html>) durchgeführt.

6.1.1 Überprüfung des *crf2*-Transkripts als *splicing*-Variante des *crf1*-Gens

Die Überprüfung, ob es sich bei dem *crf2*-Transkript um eine *splicing*-Variante des *crf1*-Gens handelt, wurde bioinformatisch auf Nukleotidebene durchgeführt. In einem multiplen Sequenz-Alignment wurde die genomische DNA von *crf1* mit der cDNA von *crf1*, von *crf2* sowie von *asp f9* verglichen (Abbildung 15). Durch das Alignment wurden mögliche Introns und deren Position in der Gensequenz dargestellt. Die genomische DNA des *crf1* enthielt laut Datenbankangaben nur an den Nukleotidpositionen von 86→144 sowie von 429→484 Introns. Da die Aminosäuresequenz von Position 311→404 im Crf2 Protein fehlte (Abbildung 14), hätte es dementsprechend an den Nukleotidpositionen 1096 und 1282 bisher unbekannte *splicing*-Donor- und Akzeptorstellen geben müssen (Abbildung 15). Auf genomischer Ebene gibt es in diesem Bereich jedoch kein Intron und eine Analyse der genomischen DNA von *crf1* mit der Datenbank NetAspGene1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk>

/services/NetAspGene/) ergab für diese Positionen keine möglichen *splicing*-Donorstellen und -Akzeptorstellen (Daten siehe Anhang). Das *crf2*-Transkript ist bioinformatisch demnach keine *splicing*-Variante des *crf1*-Gens.

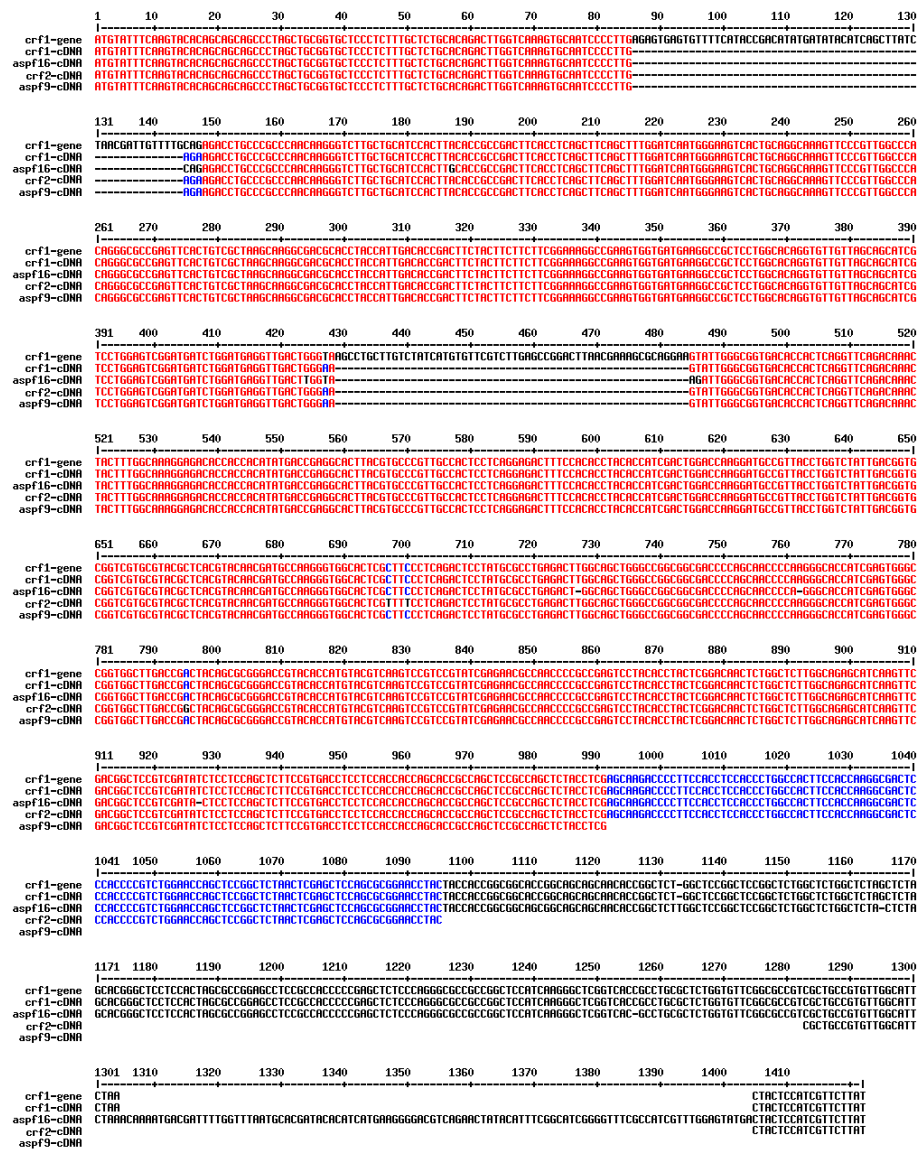


Abbildung 15: Bestimmung der *splicing*-Donor- und Akzeptorstellen von den Transkripten *crf2* und *asp f9*

Das multiple Sequenz-Alignment wurde mit der genomischen DNA von *crf1* (*locus AFUA_1G16190*) mit der cDNA von *crf1* (XM747892), *asp f16* (AF062651), *crf2* und *asp f9* (AJ223327) durchgeführt. Über das Alignment wurden graphisch die *splicing*-Bereiche von *crf1*, *crf2* und *asp f9* angezeigt. Alle Gene besaßen identische Introns von Nukleotidposition 86→144 und 429→484. Es wurden keine zusätzlichen *splicing*-Stellen an den Nukleotidpositionen 1096 und 1282 ermittelt, die ein *crf2*-Transkript hätten erklären können.

6.1.2 Klonierung, Produktion und Reinigung der Antigene Crf2 und Crf2-BAD

Für weitere proteinbiochemische Analysen wurden das Protein Crf2 und dessen *in vivo* biotinylierte Proteinvariante Crf2-BAD im Schüttelkoben in *E. coli* BLR (DE3)-Zellen produziert.

Die Reinigung beider Proteinvarianten erfolgte mittels *Ion Metal Affinity Chromatography* (IMAC) über einen N-terminalen His-tag. Die Elutionsfraktionen der IMAC wurden gegen Tris HCl dialysiert und in einem zweiten Reinigungsschritt wurden beide Crf2 Proteinvarianten mittels Anionenaustauscherchromatographie (IEC) gereinigt. Die Produktion und Reinigung wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Immunfärbung analysiert (Abbildung 16). Die Konzentrationen des gereinigten Crf2- und Crf2-BAD Proteins wurden densitometrisch quantifiziert (Daten nicht gezeigt).

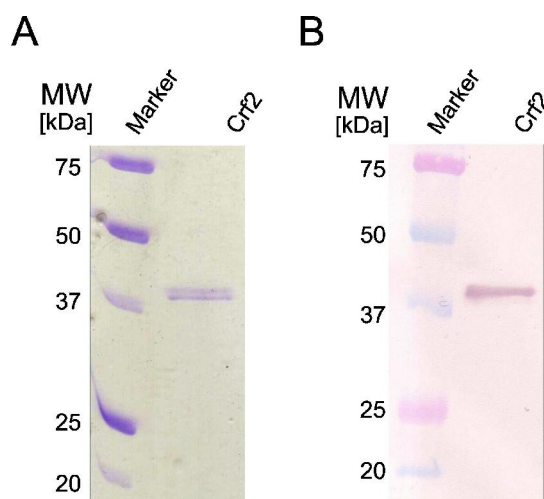


Abbildung 16: Produktion und Reinigung des rekombinanten Proteins Crf2

Zur Überprüfung der Reinheit des gereinigten Crf2-Proteins wurde eine SDS-PAGE mit einem 12 %igen PAA-Gel durchgeführt. Pro Spur wurden 5 µL gereinigtes Crf2-Protein (1:200) aufgetragen. Nach Auftrennung des Proteins erfolgte eine Coomassiefärbung (A) oder ein Western Blot mit Immunfärbung (B). Der Nachweis des Crf2-Proteins erfolgte bei der Immunfärbung mit einem Maus-anti-His₆ Antikörper (1:10.000) und einem Ziege-anti-Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Substrat: NBT/BCIP. Für das gereinigte Crf2-Protein konnte eine spezifische Bande mit der Größe von 37 kDa nachgewiesen werden. Das *in vivo* biotinylierte Crf2-BAD-Protein hatte eine spezifische Bande bei ≈45 kDa (Daten nicht gezeigt).

6.2 Immunisierungsstudie mit rekombinantem Crf2-Protein

In aktiven Immunisierungen wurde die Glykosylhydrolase Asp f16 sowohl als immunogen und protektiv gegen die IA als auch eine spezifische Antikörperantwort auslösend beschrieben [58-60]. Die Aminosäuresequenzen der Proteine Asp f16, Crf1 und Crf2 sind über weite Abschnitte identisch und daher könnten die Antigene Crf1 und Crf2 ebenso für eine aktive Immunisierung geeignet sein (Abbildung 14). Beim Protein Asp f16 befinden sich im Vergleich zu den Sequenzen der Proteine von Crf1 und Crf2 zwischen der Aminosäureposition 187 und 255 sowie nach der Aminosäure 323 *frameshifts* (Abbildung 14). Da die immunogenen Epitope des Asp f16 Proteins bisher nicht bestimmt wurden, könnten sich die immunogenen Epitope sowohl in den identischen Bereichen zwischen dem Asp f16- und dem Crf2-Protein als auch im *frameshift* vom Asp f16-Protein befinden.

Ob die neue Proteinvariante Crf2 bei einer aktiven Immunisierung protektiv wirkt und welche Aminosäuresequenzen immunogen sind, wurde in Immunisierungsstudien mit Mäusen analysiert. Der schematische Ablauf der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein ist in der Abbildung 17 dargestellt. Für die Immunisierung wurden jeweils zwei Gruppen mit je zehn C57/BL6 Mäusen verwendet (Die Durchführung der Immunisierung erfolgte in Kooperation, AG Gunzer, Abteilung Molekulare Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg). Die Mausgruppe 1 wurde entsprechend dem Immunisierungsschema mit 50 µg Crf2-Protein und die Mäuse der Kontrollgruppe 2 mit PBS durch subcutane (s.c.) Injektion immunisiert. Die Immunsupprimierung erfolgte durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 100 µg des Antikörpers Ly-6G (Gr-1), der neutrophile Granulozyten depletiert [113]. Die intranasale Infektion aller Mäuse mit $5 \cdot 10^5$ Sporen des *A. fumigatus*-Stamms D141 erfolgte am Tag 0 [114].

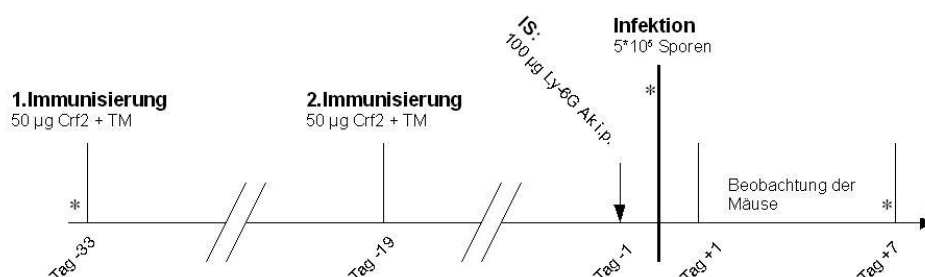


Abbildung 17: Immunisierungsschema der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein

Am Tag -33 und -19 wurden die Mäuse der Gruppe 1 mit 50 µg rekombinantem Crf2-Protein und dem inkompletten Adjuvanz TiterMax (TM) und die Mäuse der Kontrollgruppe 2 mit PBS und dem TiterMax subcutan immunisiert. Am Tag -1 wurde intraperitoneal mit 100 µg des Depletierungsantikörper Ly-6G (Gr1) immunsupprimiert und am Tag 0 mit $5 \cdot 10^5$ Sporen von *A. fumigatus* intranasal infiziert. Von Tag +1 bis +7 wurde das Überleben der infizierten Mäuse dokumentiert. Die Entnahme der Serumproben fand am Tag -33, Tag 0 und Tag +7 statt. Diese sind mit einem * gekennzeichnet.

Vom Tag +1 bis +7 wurde das Überleben (Abbildung 18) der Mausgruppen dokumentiert. Alle Mäuse aus der Crf2-Protein immunisierten Gruppe 1 haben eine intranasale Infektion mit *A. fumigatus* Sporen überlebt. Aus der PBS immunisierten Gruppe 2 überlebten hingegen nur zwei Mäuse (Maus 4 und Maus 10) eine Infektion. Für weitere Analysen wurden die Seren vor der Immunisierung (Tag -33), vor der Infektion (Tag 0) und nach der Infektion (Tag +7) verwendet.

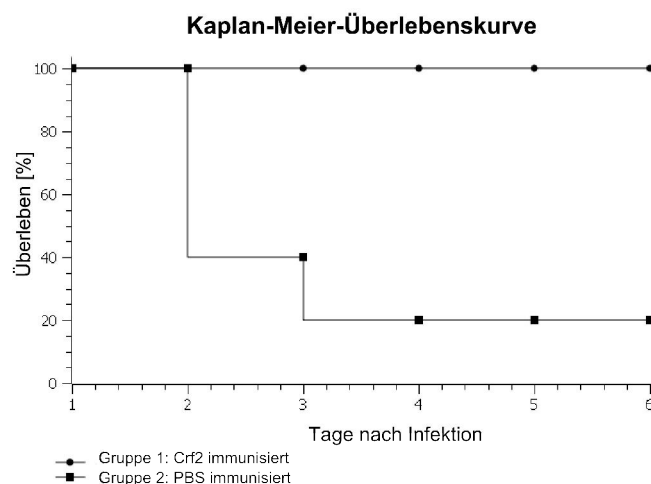


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve aus der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein

Vergleich der Anzahl überlebender Mäuse aus der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein und PBS in Prozent. Der Zeitraum der Messung war von Tag +1 bis +7.

6.2.1 ELISA mit den anti-Crf2-Immunsere

Die Bestimmung der spezifischen anti-Crf2-Antikörper im Serum kann durch einen klassischen, indirekten Antigen-ELISA erfolgen. Dieser erfordert jedoch für jede nachzuweisende Antikörperklasse und jede nachzuweisende Spezies einen entsprechenden Nachweisantikörper. Der Aufbau des *Bridging*-ELISAs (vgl. Abbildung 19) ermöglicht dagegen den spezies- und isotypenunabhängigen Nachweis aller multivalenten Antikörperklassen und ist dadurch nicht nur sensitiver, sondern auch spezifischer als ein indirekter ELISA. Der nachzuweisende Antikörper bindet in diesem ELISA mit einer Antigenbindungsstelle das immobilisierte und mit der anderen gleichzeitig das biotinylierte Antigen in Lösung und wird darüber indirekt über ein Streptavidin HRP-Konjugat nachgewiesen. Im *Bridging*-ELISA werden jedoch alle Antikörperklassen gleichzeitig nachgewiesen wodurch keine Differenzierung der Isotypen möglich ist.

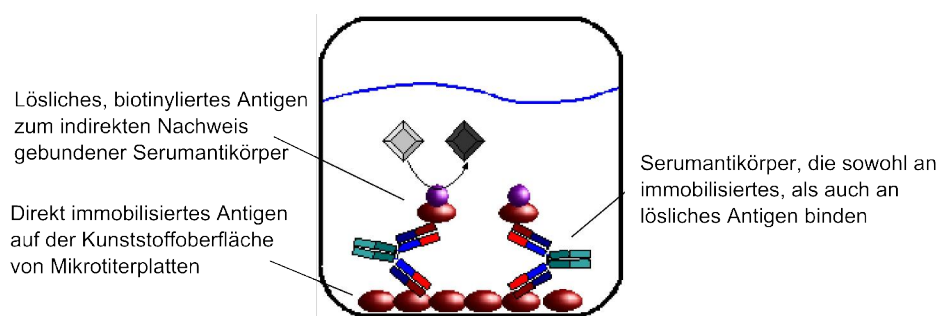


Abbildung 19: Schematischer Aufbau eines *Bridging*-ELISAs

Der multivalente Antikörper bindet mit einer Antigenbindungsstelle an das immobilisierte Crf2-Protein und mit der anderen Bindestelle an das biotinylierte lösliche Crf2-BAD-Protein. Über dieses erfolgt der indirekte Nachweis der gebundenen anti-Crf2-Antikörper.

Für den *Bridging*-ELISA wurden die Seren der Crf2-Protein-immunisierten Gruppe 1 und der PBS-immunisierten Kontrollgruppe 2 jeweils vor der Immunisierung (Tag -33), vor der Infektion (Tag 0) und nach der Infektion (Tag +7) verwendet.

Die statistische Auswertung des *Bridging*-ELISAs erfolgte in einer Box-Whisker-Plot-Darstellung (Abbildung 20).

In den Seren der PBS-Kontrollgruppe 1 wurden nur bei der überlebenden Maus 10 spezifische anti-Crf2-Antikörper nachgewiesen. Das Serum der überlebenden Maus 4 enthielt hingegen keine spezifischen anti-Crf2-Antikörper. Am Tag -33 befanden sich in den Seren aller Mäuse aus der Crf2-immunisierten Gruppe 2 keine spezifischen anti-Crf2-Antikörper. Im Gegensatz dazu wurde in den

Seren der Gruppe 1 nach der Immunisierung (Tag 0) mit rekombinantem Crf2-Protein und nach der Infektion mit *A. fumigatus* Sporen spezifische Antikörper im *Bridging*-ELISA gegen rekombinantes Crf2-Protein nachgewiesen (Abbildung 20).

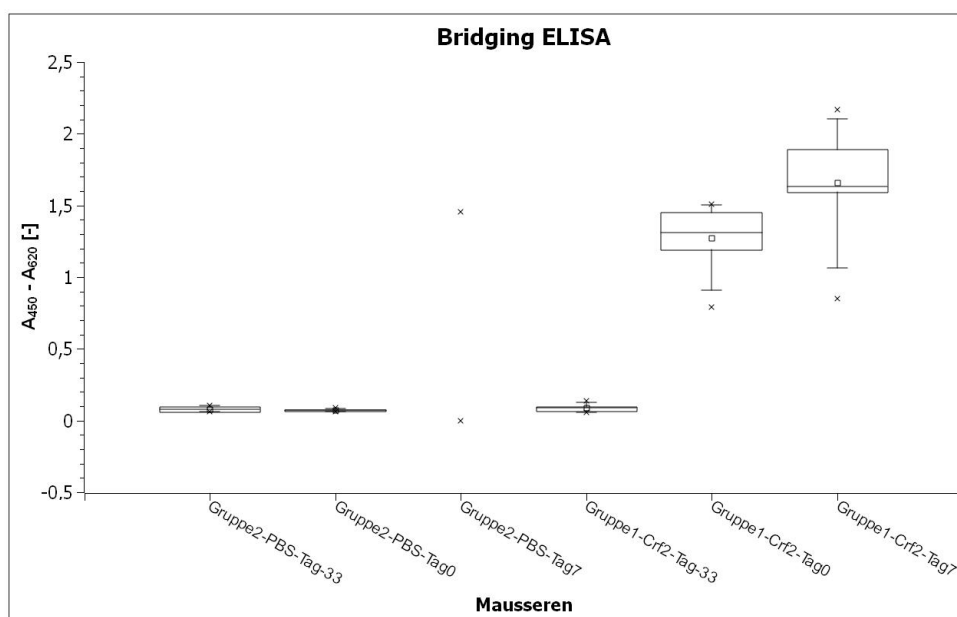


Abbildung 20: Auswertung des *Bridging*-ELISAs im Kastendiagramm

Mittels eines *Bridging*-ELISAs wurden die Seren aus der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein und PBS auf spezifische anti-Crf2 Antikörper untersucht. Der *Bridging*-ELISA ermöglicht eine spezies- und isotypenunabhängige Detektion von antigenspezifischen Antikörpern. Die Bindung spezifischer Antikörper wurde indirekt über das *in vivo* biotinylierte Crf2-BAD-Protein und Streptavidin HRP (1:10.000) nachgewiesen. Substrat: TMB. Die statistische Auswertung erfolgte im Kastendiagramm. Der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte sind als Werte der Fünf-Punkte-Zusammenfassung dargestellt.

Der Titer der spezifischen anti-Crf2 IgG-Serumantikörper wurde in einem indirekten Antigen-ELISA bestimmt. Für die Bestimmung des Antikörper-Titers wurde mit den Seren eine Verdünnungsreihe von 1:4.000 bis 1:512.000 erstellt. Als IgG-Antikörper-Titer wurde die höchste Verdünnungsstufe definiert, bei dem das ELISA-Signal noch fünffach über dem der Negativkontrolle lag. In den Seren der Crf2-immunisierten Gruppe 1 lag der Crf2-spezifische IgG-Antikörper-Titer nach der Immunisierung und der Infektion (Tag 0 und Tag +7) durchschnittlich bei 1:256.000. Im Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe war der anti-Crf2 IgG-Antikörper-Titer nach der Infektion (Tag +7) bei 1:256.000. Im Gegensatz dazu war der anti-Crf2 IgG-Antikörper-Titer für die Maus 4 außerhalb des Meßbereichs und konnte nicht bestimmt werden (Daten im Anhang).

6.2.2 Western Blot und Immunfärbung mit anti-Crf2-Immunsere

Mittels Western Blot und anschließender Immunfärbung sollte nachgewiesen werden, ob die anti-Crf2 Serumantikörper an lineare Epitope des rekombinanten Crf2-Proteins binden. Die Immunfärbung wurde in einer *multiscreen*-Kammer durchgeführt, wobei die Antigenkonzentration in der SDS-PAGE so eingestellt wurde, dass sich später in jeder Spur der PVDF-Membran 1 µg rekombinantes Crf2-Protein befand. Der Nachweis der anti-Crf2-Antikörper aus den Seren vor der Immunisierung (Tag -33), nach der Immunisierung (Tag 0) und nach der Infektion (Tag +7) erfolgte durch ein anti-Maus-IgG spezifisches Antikörperkonjugat. Das Serum der überlebenden Maus 10 (Tag +7) aus der PBS-Kontrollgruppe 2 band denaturiertes, rekombinantes Crf2-Protein im Western Blot. Hingegen enthielt das Serum der Tage -33 und 0 keine spezifischen anti-Crf2-Serumantikörper. Die anti-Crf2-Antikörper in den Seren nach Immunisierung (Tag 0) und nach Infektion (Tag +7) der Crf2-immunisierten Gruppe 1 banden das denaturierte, rekombinante Crf2-Protein im Western Blot. Der Nachweis der Positivkontrolle erfolgte über den His-tag des Antigens und färbte wie die anti-Crf2-Serumantikörper eine Bande bei ≈37 kDa (Abbildung 21).

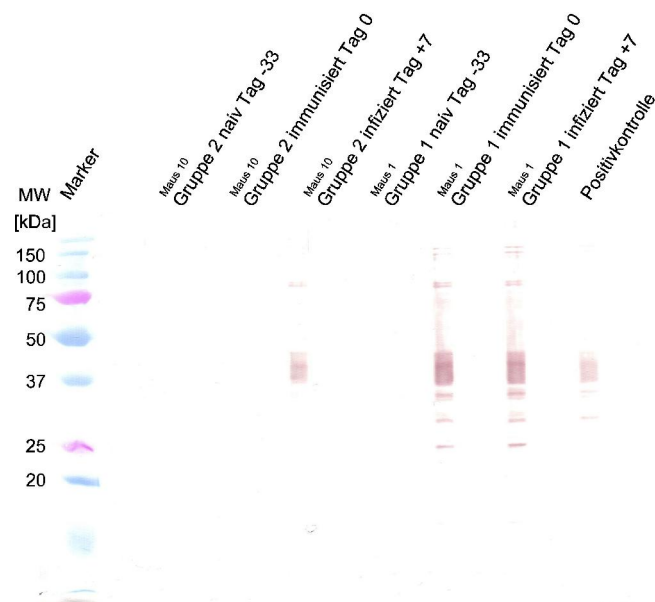


Abbildung 21: Western Blot mit Immunfärbung mit anti-Crf2-Immunsere

Je Spur wurde 1 µg rekombinantes Crf2 Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Exemplarisch wurde die Bindung des polyklonalen Antikörpergemisches mit dem Serum (1:400) der Maus 1 aus der Crf2-Protein-immunisierten Gruppe 1 und mit dem Serum der Maus 10 aus PBS-Kontrollgruppe 2 auf denaturiertes Crf2-Protein untersucht. Der Nachweis der gebundenen Serumantikörper erfolgte über das Ziege-anti-Maus-IgG (Fab spez.) AP-Konjugat (1:5.000). Substrat: NBT/BCIP.

6.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie mit den anti-Crf2-Immunsere

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde mit den Immunsere überprüft, wo das native, zellwandassoziierte Crf2-Protein auf Hyphen oder Sporen von *A. fumigatus* lokalisiert ist und ob es ein spezifisches Färbemuster auf diesen gibt. Neben *A. fumigatus* wurde der humanpathogene Hefepilz *Candida albicans* für Kreuzreaktionen der Serumantikörper verwendet. Für das Auskeimen der Sporen wurden zuvor beide Pilze für 24 Stunden in einem Komplexmedium bei 37 °C inkubiert.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Sere der Mäuse aus der Crf2-immunisierten Gruppe 1 sowie das Serum der Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe 2 vor der Immunisierung (Tag -33), vor der Infektion (Tag 0) und nach der Infektion (Tag +7) in der Verdünnung 1:500 verwendet. Die Detektion erfolgte über einen FITC-konjugierten Antikörper, welcher gegen das murine IgG Fc-Fragment gerichtet ist. Alle Mikroskopieaufnahmen erfolgten im Hellfeld und mit einem Fluoreszenzfilter (FITC).

Vor Immunisierung (Tag -33) banden in keinem der untersuchten Maussere Antikörper an *A. fumigatus*. Es wurden weder Sporen noch Hyphen von *A. fumigatus* oder von *C. albicans* gefärbt (Abbildung 22). Nur die Sere nach der Immunisierung und nach der Infektion der Crf2-immunisierten Gruppe 1 enthielten spezifisch an *A. fumigatus* bindende anti-Crf2-Antikörper. Diese färbten indirekt basal und apikal Hyphen und auskeimende Sporen an. Ruhende Sporen wurden hingegen nicht gefärbt. Das Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe enthielt erst nach Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* am Tag +7 spezifisch bindende Antikörper gegen Hyphen von *A. fumigatus* (Abbildung 22C). Das Färbemuster der Hyphen und auskeimenden Sporen entsprach dem mit den Sere der Crf2-immunisierten Mäuse vom Tag 0 und Tag +7. Keines der Sere der immunisierten oder infizierten Mäuse enthielt Antikörper, welche mit Sporen oder Hyphen von *C. albicans* kreuzreagierten (Abbildung 22B und D).

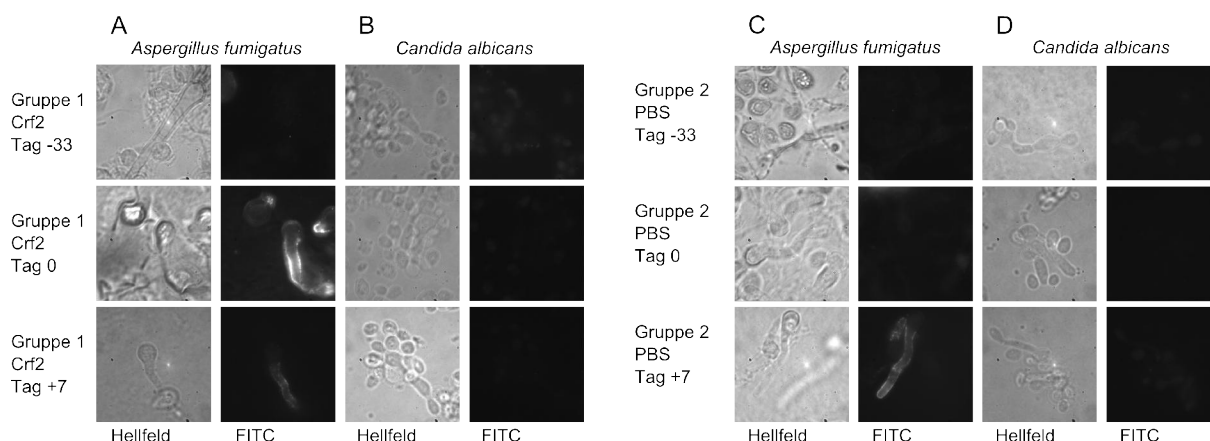


Abbildung 22: Immunfluoreszenzmikroskopie mit den anti-Crf2-Immunsereen

Indirekte Immunfärbung auf auskeimenden Sporen und Hyphen von *A. fumigatus* und *C. albicans* mit Sereen aus der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2 Protein und PBS. Es wurden die Mausereen der Crf2-immunisierten Gruppe 1 **(A)** und **(B)** und das Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe 2 **(C)** und **(D)** vor Immunisierung (Tag -33), nach Immunisierung (Tag 0) und nach Infektion (Tag +7) für die Mikroskopie im Hellfeld und mit dem Fluoreszenzfilter verwendet.

6.2.4 Epitop-Kartierung mit den anti-Crf2-Immunsereen

Für die Epitop-Kartierung auf Peptidspotmembranen wurden die Mausereen der Crf2-immunisierten Gruppe 1 und das Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe verwendet.

Die Mausereen vom Tag 0 der Crf2-immunisierten Gruppe 1, d. h. vor der Infektion mit Sporen von *A. fumigatus*, enthielten zu diesem Zeitpunkt nur spezifische Antikörper gegen das rekombinante Crf2-Protein. Mit diesen Sereen wurde eine Epitop-Kartierung auf einer Crf2-Peptidspotmembran durchgeführt um die immunogenen Epitope des rekombinanten Crf2-Proteins zu bestimmen.

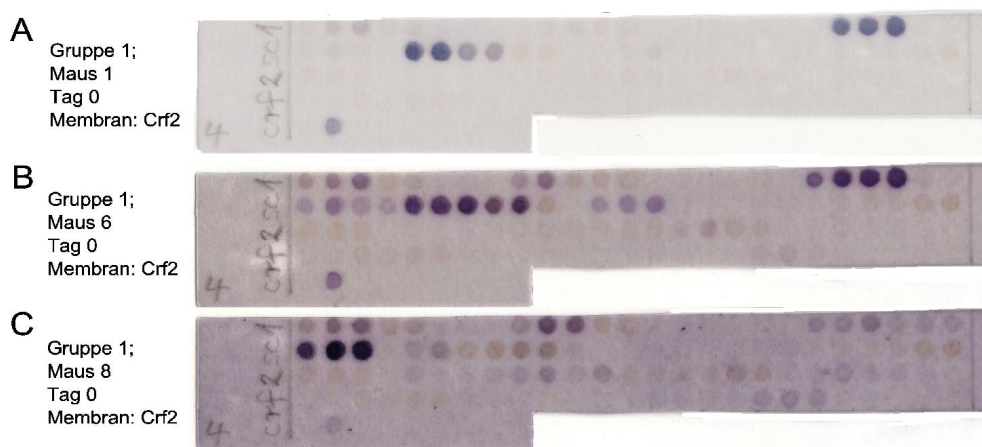


Abbildung 23: Epitop-Kartierung auf einer Crf2-Peptidspotmembran mit den anti-Crf2-Immunseren

Exemplarische Darstellung der Epitop-Kartierung mit den Seren vom Tag 0 (1:400) der Crf2-immunisierten Mäuse 1, 6 und 8 auf einer Crf2-Peptidspotmembran. Der Nachweis der gebundenen Serumantikörper erfolgte per Immunfärbung über ein Ziegenanti-Maus-IgG (Fc spez.) (1:500) AP-Konjugat. Substrat: MTT/BCIP.

Die Epitop-Kartierung mit den Seren nach der Immunisierung (Tag 0) der Crf2-immunisierten Gruppe 1 ergab für alle Seren sowohl gemeinsame, identische Epitope unterschiedlicher Intensität und Größe, als auch für jedes Mausserum zusätzliche, unterschiedliche Epitope. Die Crf2-spezifische Peptidsequenz NSSSSAEPTAAVLAF wurde von allen Seren als Epitop erkannt (Abbildung 24).

Aminosäuresequenz von Crf2

SAQ**TWSKCNPLEKTCPPNKGL**AAS**TYTADFTSA**SALDQWEVTAGKVPVGPQGAEFTV**AKQGDAPTIDTDFYFFFGKA**
 EVVMKA**AAPGTGVVSSIVLE****SDDLDEVDWEVLGGDTTQ**VQTNFYFGKG**DTTTYDRGTYVPVAT**PQETFHTYTIDWTKDA
 VTWSIDGAVVRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDPSNPKGT**IEWAGGLTGYSAGPYTMVKS**VRIENANPAESYTY
 SDNSGSWQSIKFDGSVDISSSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTS**TLATSTKAT**PTPSGTSSGS**NSSSSAEPTAAVLAF**

Abbildung 24: Erkannte Epitope auf einer Crf2-Peptidspotmembran mit anti-Crf2-Immunseren

Epitop-Kartierung mit den Mausseren aus der Crf2-immunisierten Gruppe 1 vom Tag 0 auf einer Crf2-Peptidspotmembran. Die fett gedruckten Aminosäuresequenzen ist die Gesamtheit aller linearer Epitope, die durch die Immunseren der Gruppe 1 erkannt wurden. Fett gedruckte und unterstrichene Aminosäuresequenzen sind die Epitope, die von allen individuellen Seren dieser Gruppe gemeinsam erkannt wurden.

Das Serum nach Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* (Tag +7) enthielt bei der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe 2 ein polyklonales Antikörpergemisch, welches gegen rekombinantes Crf2-Protein gerichtet war, aber auch gegen andere immunogene Antigene des *A. fumigatus* hätte gerichtet sein können. Dieses Serum wurde auf einer Crf2-, einer Crf1- und einer Asp f16-Peptidspotmembran verwendet. Dadurch konnten neben identischen Epitopen zum

rekombinanten Crf2-Protein auch Crf1-spezifische Epitope oder immunogene Epitope im Bereich der *frameshift*-Regionen vom Protein Asp f16 bestimmt werden.



Abbildung 25: Epitop-Kartierung auf einer Crf2-, Crf1- und Asp f16-Peptidspotmembran mit anti-Crf2-Immunsereen

Für die Epitop-Kartierung wurde das Serum nach der Infektion (Tag +7) der PBS-immunisierten Maus 10 auf einer Crf2-, Crf1 und Asp f16-Peptidspotmembran in der Verdünnung 1:400 verwendet. Der Nachweis der gebundenen Serumantikörper erfolgte durch Immunfärbung über ein Ziege-anti-Maus-IgG (Fc spez.) (1:500) AP-Konjugat. Substrat: MTT/BCIP.

Die Antikörper im Mausserum nach der Infektion (Tag +7) der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe 2 banden auf der Crf2 Peptidspotmembran die Peptidsequenzen SDDLDEVDWE, IEWAGGLTGYSAGPY, TLATSTKAT und NSSSSAEPTAAVLAF. Die identischen Epitope wurden mit den Seren nach der Immunisierung (Tag 0) aus der Crf2-immunisierten Gruppe 1 erkannt.

Mit dem Serum der Maus 10 wurden auf der Crf1-Peptidspotmembran lediglich die Peptidsequenzen SDDLDEVDWE, IEWAGGLTGYSAGPY und TLATSTKAT gefärbt. Die im Crf1-Protein voneinander getrennten Aminosäureabschnitte NSSSSAEPT oder AAVLAF wurden hingegen nicht gebunden. Des Weiteren wurden keine weiteren Epitope im Crf1-spezifischen Aminosäureabschnitt vom Serum der Maus indirekt angefärbt.

Auf der Asp f16-Peptidspotmembran wurden von den Antikörpern im Serum der Maus 10 nur die Peptidsequenzen SDDLDEVDWE und TLATSTKAT gebunden. In den *frameshift*-Regionen der Asp f16-Aminosäuresequenz befanden sich keine zusätzlichen Epitope.

Eine Kreuzreaktionen zwischen Serum und der Peptidmembran wurden mit dem Serum einer nicht immunisierten und infizierten Maus ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

A: Aminosäuresequenz von Crf2

SAQTWSKCNPLEKTCPPNKGLAASTYTADFTSASALDQWEVTAGKVPVGPQGAFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMK
 AAPGTGVVSSIVLE**SDDLDEVDWE**VLGGDTTQVQTNFYFGKGDTTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYITIDWTKDAVTWSIDGAV
 VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDPSNPKGT**IEWAGGLTGYSAGPY**TMYVKSVRIENANPAESYTYSDNSGSWQ
 SIKFDGSVDISSSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTS**TLATSTKAT**PTPSGTSSGS**NSSSSAEPTAAVLAF**

B: Aminosäuresequenz von Crf1 (accession no. XP_752985)

SAQTWSKCNPLEKTCPPNKGLAASTYTADFTSASALDQWEVTAGKVPVGPQGAFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMK
 AAPGTGVVSSIVLE**SDDLDEVDWE**VLGGDTTQVQTNFYFGKGDTTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYITIDWTKDAVTWSIDGAV
 VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDPSNPKGT**IEWAGGLTDYSAGPY**TMYVKSVRIENANPAESYTYSDNSGSWQ
 SIKFDGSVDISSSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTS**TLATSTKAT**PTPSGTSSGSNSSSSAEPT*TTGGTGSSTGSGSG*
*SGSGSGSSSTGSSTSAGASATPELSOGAAGSIKGSVTACALVFGA*AAVLAF

C: Aminosäuresequenz von Asp f16 (accession no. AAC61261)

SAQTWSKCNPLAETCPPNKGLAASTCTADFTSASALDQWEVTAGKVPVGPQGAFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMK
 AAPGTGVVSSIVLE**SDDLDE**VDLVLGGDTTQVQTNFYFGKGDTTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYITIDWTKDAVTWSIDGAV
 RLTLYNDAKGGTRFPQTPMRLRLAAGPAATPATPGHHRVGRWLDRLQRTVHHVQVRPYREROPRRVLHLLGQLWLLAEHQ
VRRLRRYSSSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTS**TLATSTKATP**TPSGTSSGSNSSSSAEPTTTGGSGSSNTGSWRLRL
WLWLYSSTGSSTSAGASATPELSOGAAGSIKGSVTPALWCSAPSLPCWHKONDDFGLMHDTHHEGDVRTIHFGIGV

Abbildung 26: Erkannte Epitope auf einer Crf2-, Crf1- und Asp f16-Peptidspotmembran mit dem Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe vom Tag +7

Die erkannten Epitope sind in fett gedruckt. Die identischen Epitope für die Proteine Crf2, Crf1 und Asp f16 sind in fett gedruckt und einfach unterstrichen (**A, B** und **C**). Die Crf1-spezifische Aminosäuresequenz ist kursiv gedruckt und gepunktet unterstrichen (**B**). Die *frameshift*-Regionen vom Asp f16-Protein sind doppelt unterstrichen (**C**). Weder in der Crf1-spezifischen Aminosäuresequenz, noch in den *frameshift*-Regionen vom Asp f16-Protein befinden sich zusätzliche Epitope, die von den Serumantikörpern der infizierten Maus 10 erkannt wurden.

6.3 Konstruktion der anti-Crf2 Immunantikörpergenbibliothek

Für die Herstellung einer anti-Crf2 Immunantikörpergenbibliothek wurde ein männlicher Makake mit rekombinantem Crf2-Protein in zeitlich definierten Abständen viermal s.c. immunisiert. Der IgG-Antikörper-Titer wurde anschließend in einem Antigen-ELISA mit Crf2-Protein auf 1:256.000 bestimmt.

Zunächst erfolgte die Isolierung der RNA aus dem Knochenmark des Makaken und die Synthese der cDNA. Anschließend wurden die V_H- und V_L-Antikörpergensequenzen mittels PCR amplifiziert und in einen pGEMT-Vektor kloniert (die Durchführung erfolgte in Kooperation mit P. Thullier am Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche in Frankreich). Die resultierenden Subbibliotheken hatten eine Diversität von $6,2 \cdot 10^5$ Klonen für die V_H-Gen-Fragmente und $1,6 \cdot 10^6$

Klone für die V_L -Gen-Fragmente. In zwei aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten, beginnend mit der Klonierung der V_H -Sequenzen und gefolgt von den V_L -Sequenzen, wurde die anti-Crf2 scFv Immunbibliothek MAYKI in den Phagemid-Vektor pHAL14 kloniert (Abbildung 27).

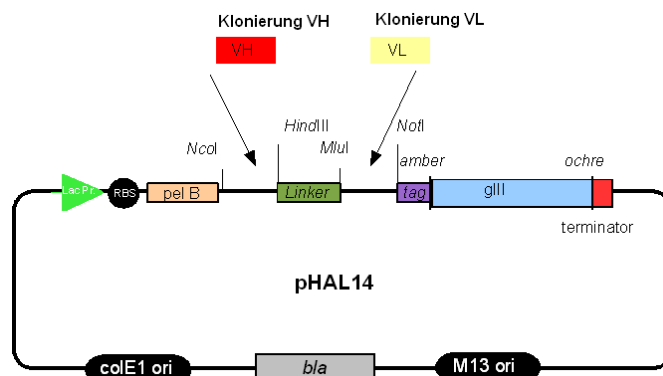


Abbildung 27: Herstellung der anti-Crf2 Immunantikörpergenbibliothek MAYKI - schematisch

Für die Klonierung der V_H -Fragmente wurden die V_H -Gensequenzen und der Phagemid-Vektor pHAL14 mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* geschnitten und anschließend ligiert. Nach der Klonierung wurden die V_L -Fragmente über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* in den Phagemid-Vektor pHAL14 kloniert.

Die erstellte anti-Crf2 scFv Immunbibliothek hatte eine Diversität von $1,5 \cdot 10^7$ individuellen Klonen und enthielt zu 80 % vollständige Antikörperfragmente. Die anti-Crf2 Immunbibliothek wurde mit Hyperphage verpackt.

6.4 Antikörperselektion gegen die Glykosylhydrolase Crf2 von *A. fumigatus*

Für die Selektion von Antikörperfragmenten gegen das rekombinante Crf2-Protein wurden zwei Antikörpergenbibliotheken verwendet.

Für die Generierung humaner Antikörperfragmente wurde die humane, naive Antikörpergenbibliothek HAL4/7 und für die Generierung potentiell affinitätsgereifter, humanähnlicher Antikörperfragmente die anti-Crf2 Immunantikörpergenbibliothek MAYKI verwendet [115]. Mit jeder Antikörpergenbibliothek wurden zwei unterschiedliche Selektionsstrategien durchgeführt.

Bei der Selektionsmethode 1 wurde zuerst das rekombinante Crf2-Protein auf der reaktiven Kunststoffoberfläche von Mikrotiterplatten (MTP) immobilisiert und anschließend wurden die Antikörpergenbibliotheken auf dem immobilisierten Antigen inkubiert.

Die Selektion der Antikörperfragmente im monoklonalen-ELISA erfolgte bei dieser Selektionsmethode mit immobilisiertem Crf2-Protein in MTPs.

Um eine partielle Denaturierung des Antigens durch direkte Immobilisierung an Kunststoffoberflächen zu vermeiden, wurde die Antikörperselektionsstrategie 2 in Lösung mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein durchgeführt. Diese Selektionsmethode unterschied sich darin, dass zuerst eine Inkubation der Antikörpergenbibliothek mit dem Antigen in Lösung erfolgte und anschließend das antikörpergebundene Antigen mittels *pull down* an magnetischen Streptavidin-*beads* isoliert wurde. Bei der Antikörperselektion in Lösung wurde der monoklonale-ELISA auf *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein, das indirekt in Streptavidin-Mikrotiterplatten immobilisiert wurde, durchgeführt.

6.4.1 Antikörperselektion A1 in Mikrotiterplatten mit der naiven humanen Antikörpergenbibliothek HAL4/7

Bei der Antikörperselektion mit der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 wurde für die erste Selektionsrunde 100 ng, für die zweite 50 ng und für die dritte 10 ng rekombinantes Crf2-Protein in MTP immobilisiert [115].

Im monoklonalen-ELISA wurden 190 Einzelklone aus der zweiten und dritten Selektionsrunde als lösliche Antikörperfragmente produziert und auf Bindung an immobilisiertes Crf2-Protein getestet. Von den 190 Einzelklonen banden elf lösliche scFvs im monoklonalen-ELISA und ergaben ein Signal $A_{450nm} > 0,5$. Diese wurden für die Sequenzanalyse verwendet (Daten im Anhang).

6.4.2 Antikörperselektion B1 in Mikrotiterplatten mit der Makaken-Immunkörpergenbibliothek MAYKI

Bei der Antikörperselektion mit der Antikörpergenbibliothek MAYKI wurde für die erste Selektionsrunde 100 ng, für die zweite 100 ng und für die Dritte 10 ng rekombinantes Crf2-Protein in MTP immobilisiert. Von den 188 löslichen scFv-Einzelklonen aus den drei Selektionsrunden banden 67 im monoklonalen-ELISA ihr Antigen mit einem Signal $A_{450nm} > 0,15$ (Abbildung 28). Diese wurden für die weitere Sequenzanalyse verwendet. Die ELISA-Signale waren geringer im Vergleich zum monoklonalen-ELISA mit den HAL 4/7 scFv-Klonen.

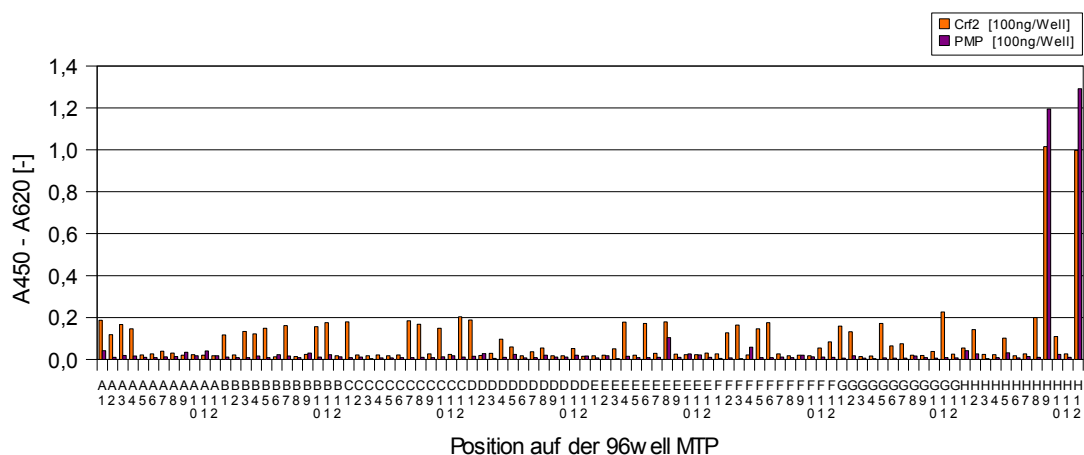


Abbildung 28: Monoklonaler ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörperselektion B1

Für den monoklonalen-ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörpergenbibliothek MAYKI und der Antikörperselektion mit direkt immobilisierten Crf2-Protein wurden in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte 100 ng Crf2-Protein bzw. als Negativkontrolle 100 ng Peroxisomales Membranprotein (PMP) immobilisiert. Nach der Produktion von löslichen scFvs der Einzelklone wurden 50 µL des Kulturüberstands mit 50 µL Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über einen Maus-anti-c-myc-IgG 9E10 Antikörper (1:1.000) und einem Ziege-anti-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

6.4.3 Antikörperselektion A2 in Lösung mit der naiven humanen Antikörpergenbibliothek HAL 4/7

Für die Antikörperselektion in Lösung wurden für die erste Selektionsrunde 100 ng, für die zweite 100 ng und für die dritte 10 ng *in vivo* biotinyliertes Crf2-BAD-Protein mit der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 inkubiert. Von den 184 Einzelklonen aus der zweiten und dritten Selektionsrunde zeigten im monoklonalen-ELISA mit biotinyliertem Antigen nur zwei lösliche scFv-Klone ein Signal. Diese wurden sequenziert und analysiert. Die scFv-Klone banden nicht Streptavidin (Daten im Anhang).

6.4.4 Antikörperselektion B2 in Lösung mit der Makaken-Immunantikörpergenbibliothek MAYKI

Für die Antikörperselektion in Lösung mit der Antikörperbibliothek MAYKI inkubierten jeweils in der ersten Runde 100 ng, in der zweiten 100 ng und in der Dritten 10 ng *in vivo* biotinyliertes Crf2-BAD-Protein mit der Antikörpergenbibliothek.

Von den 184 Einzelklonen aus den drei Selektionsrunden banden im monoklonalen ELISA nur sechs scFv-Klone auf indirekt immobilisiertem Antigen (Abbildung 29). Die überprüften scFv-Klone banden nicht Streptavidin.

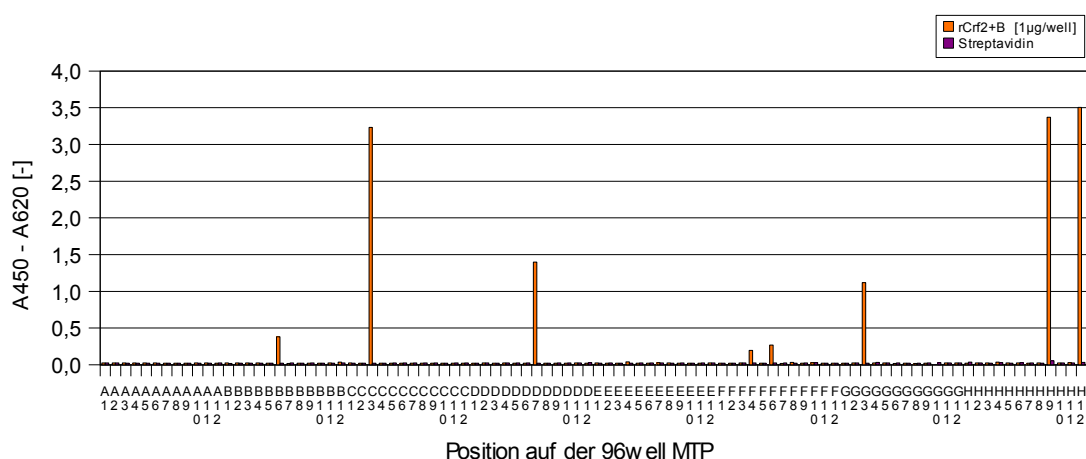


Abbildung 29: Monoklonaler-ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörperselektion B2

Für den monoklonalen-ELISA mit den löslichen scFvs aus der Antikörpergenbibliothek MAYKI und der Antikörperselektion in Lösung wurde zuvor in jeder Vertiefung der Streptavidin-Mikrotiterplatten 100 ng *in vivo* biotinyliertes Antigen immobilisiert. Als Negativkontrolle diente Streptavidin ohne biotinyliertes Protein. Nach der Produktion von löslichen scFvs der Einzelklone wurden 50 µL des Kulturüberstands mit 50 µL Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über einen Maus-anti-c-myc-IgG 9E10 Antikörper (1:1.000) und einem Ziege-anti-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

6.4.5 Zusammenfassung der unterschiedlichen Antikörperselektionsstrategien

Die Tabelle 12 zeigt zusammenfassend für jede Antikörperselektionsstrategie und verwendete Antikörpergenbibliothek die untersuchte Anzahl an Einzelklonen, die Anzahl spezifischer Binder und die Anzahl individueller anti-Crf2 scFv-Klone nach Sequenzanalyse.

Tabelle 12: Zusammenfassung der analysierten Einzelklone

Zusammenfassung der analysierten Einzelklone aus den unterschiedlichen Antikörpergenbibliotheken und den unterschiedlichen Antikörperselektionsstrategien.

Antikörpergenbibliothek	Anzahl überprüfter scFv-Klone im monoklonalen ELISA	Anzahl spezifisch bindender anti-Crf2 scFv-Klone im monoklonalen ELISA	Anzahl individueller anti-Crf2 scFv-Klone nach der Sequenzanalyse
HAL 4/7			
MTP	190	11	5
In Lösung	184	2	1
MAYKI			
MTP	188	67	4
In Lösung	184	6	6
HAL 4/7: Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 MAYKI: Immunantikörpergenbibliothek MAYKI MTP: Antikörperselektionsstrategie mit direkt immobilisiertem Crf2-Protein in Mikrotiterplatten In Lösung: Antikörperselektionsstrategie in Lösung mit <i>in vivo</i> biotinyliertem Crf2-BAD-Protein			

6.5 Bioinformatische Analysen der isolierten anti-Crf2 scFv-Klone

Eine bioinformatische Analyse der V_H - und V_L -Antikörpergensequenzen erfolgte mit der Datenbank VBASE2 [116,117]. Anhand dieser Datenbank wurden sowohl die CDR- und *framework*-Regionen als auch die Keimbahnlinien jedes anti-Crf2 scFv-Klons bestimmt.

Die Sequenzanalyse der anti-Crf2 scFv-Klone aus den zwei Antikörpergenbibliotheken mit den jeweils zwei verschiedenen Selektionsstrategien ergab 16 unterschiedliche Klone (Tabelle 13 und Tabelle 14). Die Diversität der $V V_H$ -Keimbahnlinien der isolierten Einzelklone aus der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 war größer als die $V V_H$ -Keimbahnlinien aus der anti-Crf2 Immunbibliothek MAYKI. Die Keimbahnlinien für die $V V_H$ - und $J V_H$ -Region aus der Antikörperselektion in Lösung mit löslichem Antigen und der Immunantikörpergenbibliothek MAYKI waren für alle isolierten Einzelklone identisch. Die größten Unterschiede in der Herkunft der Keimbahnlinien waren hingegen im Bereich der $V V_L$ - und $J V_L$ -Region. Die Keimbahnlinien der $V V_L$ und $J V_L$ -Region des Klons MS130i-IIIC3 hatten laut bioinformatischer Analyse eine größere Identität mit Keimbahnlinien einer Maus als mit der von Menschen. Zudem ist bei allen Einzelklonen der Immunantikörpergenbibliothek MAYKI die Diversität der Keimbahnlinien aus der V_L -Region größer als die der V_H -Region.

Tabelle 13: Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone

Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone aus der Antikörperselektion mit immobilisiertem Crf2-Protein in Mikrotiterplatten. Gesonderte Darstellung der identifizierten Keimbahnlinsen für V_H- und V_L-Regionen. Die Keimbahnlinsen wurden mit der Datenbank VBASE2 bestimmt.

Antikörperselektion	Klonname	Keimbahnlinie				
		V V _H	D V _H	J V _H	V V _L	J V _L
HAL 4/7 in MTP	DOH12.2-IIIA11	IGHV3-23*01	IGHD5-12*01	IGHJ4*02	IGKV2-30*01	IGKJ1*01
	DOH12.2-IIIB8	IGHV3-30*01	IGHD2-2*02	IGHJ3*02	IGLV1-40*01	IGLJ3*01
	DOH12.2-IIID10	IGHV3-30*01	IGHD2-2*02inv	IGHJ3*02	IGLV1-40*01	IGLJ3*01
	DOH12.2-IIID11	IGHV1-46*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	IGLV7-43*01	IGLJ3*01
	DOH12.2-IIIE11	IGHV3-30*03	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	IGLV2-8*01	IGLJ3*01
MAYKI in MTP	MS112-IIA1	IGHV4	IGHD2-2*01	IGHJ5*01	IGKV1-9*01	IGKJ2*01
	MS112-IIB1	IGHV4	IGHD3-10*02	IGHJ1*01	IGKV1-39*01	IGKJ2*01
	MS112-IB10	IGHV5-51*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	IGKV1-27*01	IGKJ4*01
	MS112-IIF5	IGHV5-51*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ1*01
HAL:		Antikörpergenbibliothek HAL 4/7				
MAYKI:		Immunantikörpergenbibliothek MAYKI				
MTP:		Antikörperselektionsstrategie mit direkt immobilisiertem Crf2-Protein in Mikrotiterplatten				

Tabelle 14: Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone

Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone aus der Antikörperselektion in Lösung mit biotinyliertem Crf2-BAD-Protein. Gesonderte Darstellung der identifizierten Keimbahnlinsen für V_H- und V_L-Regionen. Die Keimbahnlinsen wurden mit der Datenbank VBASE2 bestimmt.

Antikörperselektion	Klonname	Keimbahnlinie				
		V V _H	D V _H	J V _H	V V _L	J V _L
HAL 4/7 in Lösung	MS130-IIIC2	IGHV1-2*02	IGHD3-10*01	IGHJ2*01	IGLV3-1*01	IGLJ3*01
	MS130-IIIC3	IGHV5-51*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV4-74*01 murine	jk1 murine
MAYKI in Lösung	MS130-IIIG3	IGHV5-51*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-9*01	IGKJ3*01
	MS130-IIB6	IGHV5-51*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	IGKV1-5*03	IGKJ2*01
	MS130-IID7	IGHV5-51*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ1*01
	MS130-IIF6	IGHV5-51*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGKV1-9*01	IGKJ4*01
	MS130-IIF4	IGHV5-51*01	IGHD7-27*01	IGHJ4*02	IGKV1	IGKJ1*01
HAL 4/7:		Antikörpergenbibliothek HAL 4/7				
MAYKI:		Immunantikörpergenbibliothek MAYKI				
In Lösung:		Antikörperselektionsstrategie in Lösung mit <i>in vivo</i> biotinyliertem Crf2-BAD-Protein				

6.6 *Germinality-Index und Humanness-Analyse*

Für therapeutische Anwendungen von rekombinanten Antikörpern im Menschen sollten diese einen hohen Grad menschlicher Identität besitzen, da sie ansonst immunogen wirken könnten.

Der *germinality*-Index und die *Humanness*-Analyse sind *in silico* Verfahren zur Vorhersage wie „human“ ein rekombinanter Antikörper ist. Die Ergebnisse beruhen auf Sequenzvergleichen der zu analysierenden Antikörper mit Datenbanken. Mit diesen beiden Methoden wurde das Maß der humanen Identität der isolierten anti-Crf2 Antikörpergensequenzen bestimmt.

Für die Bestimmung des *germinality*-Index wurde zunächst die zu untersuchende Antikörpersequenz mit solchen aus der Datenbank VBASE2 verglichen und daraus die Sequenz mit der größten Übereinstimmung ermittelt. Anschließend wurde die prozentuale Identität der zu untersuchenden *framework*-Sequenz im Vergleich zu der *framework*-Sequenz aus der Datenbank berechnet [118]. Die anti-Crf2 scFv-Klone aus der humanen Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 besitzen für die V_H-*framework*-Aminosäuresequenz einen *germinality*-Index von >95 % und für die V_L-*framework*-Aminosäuresequenz einen Index von >93 %. Die anti-Crf2 scFv-Klone aus der Immunbibliothek MAYKI besitzen für die V_H-*framework*-Aminosäuresequenz hingegen nur einen Index zwischen 79–94% und für die V_L-*framework*-Aminosäuresequenz einen Index von 87–95 % (Tabelle 15).

Die *Humanness* ist ein Maß für die Sequenzhomologie einer zu untersuchenden Aminosäuresequenz der variablen Domäne eines Antikörpers mit bekannten, humanen Sequenzen aus der Kabat-Datenbank und wird über den *Z-score* quantifiziert [119]. Der *Z-score* wird aus der Standardabweichung der mittleren Sequenzhomologie des gesamten humanen Repertoires der Kabat-Datenbank errechnet. Er ist das Vielfache der Standardabweichung vom Datenbank-Repertoire-Homologie-Mittelwert, um den die zu untersuchende Sequenz abweicht. Im Gegensatz zum *germinality*-Index wird für die Berechnung des *Z-scores* die vollständige Aminosäuresequenz der variablen Domäne mit einbezogen. Für die humanen Antikörpergensequenz der Klone DoH12.2-III A11 und DoH12.2-IIID11 wurde ein *Z-score* in den Grenzbereichen der *Humanness* Skala ermittelt (Tabelle 15). Die anderen Antikörpergensequenzen lagen in einem Bereich humaner Identität.

Tabelle 15: Germinality-Index und Humaness-Analyse der anti-Crf2 scFv-Klone

Bioinformatische Analyse der anti-Crf2 Antikörpergensequenzen zur Ermittlung des *germinality*-Index und des *Z-score*s als Maß für die humane Identität der anti-Crf2 scFv-Klone. Die mathematische Grundlage des *germinality*-Index bezieht sich auf prozentuale Abweichungen in der *framework*-Sequenz zur Vergleichssequenz. Der *Z-score* wird auf Basis der vollständigen Antikörpergensequenz aus einem Repertoire von humanen Antikörpergensequenzen in der Kabat-Datenbank berechnet.

	Klonname	<i>germinality</i> -Index		<i>Z-score</i>			Klonname	<i>germinality</i> -Index		<i>Z-score</i>	
		V _H	V _L	V _H	V _L			V _H	V _L	V _H	V _L
A1	DOH12.2-IIIA11	+++	++	o	--	B1	MS112-IIA1	++	++	+++	+++
	DOH12.2-IIIB8	+++	++	+	++		MS112-IIB1	-	++	+++	+++
	DOH12.2-IIID10	+++	++	o	++		MS112-IB10	++	+++	++	+++
	DOH12.2-IIID11	+++	+++	+++	-		MS112-IIF5	++	++	++	+++
	DOH12.2-IIIE11	+++	+++	++	++						
A2	MS130-IIIC2	+++	++	+++	+++	B2	MS130-IIIC3	++	+	++	o
							MS130-IIIG3	++	+	++	++
							MS130-IIB6	++	++	++	+++
							MS130-IID7	+	+	++	++
							MS130-IIF6	+	++	++	+++
							MS130-IIF4	++	++	++	+++

- A:** Antikörpergenbibliothek HAL 4/7
B: Immunantikörpergenbibliothek MAYKI
1: Antikörperselektionstrategie mit direkt immobilisiertem Crf2-Protein in Mikrotiterplatten
2: Antikörperselektionstrategie in Lösung mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein

6.7 Charakterisierung der anti-Crf2 scFv-Klone

6.7.1 Klonierung, Produktion und Reinigung der anti-Crf2 scFv-Klone

Für die Produktion der anti-Crf2 scFv-Klone in *E. coli* XL1 Blue MRF' Zellen wurden die scFv-Gensequenzen über die Schnittstellen *NotI* und *NcoI* in den prokaryotischen Expressionsvektors pOPE101-XP kloniert und anschließend sequenziert (Daten nicht gezeigt).

Die Produktion der scFv-Fragmente erfolgte im Schüttelkolben in einem Produktionsvolumen von je 250 mL 2x TY-GA Medium. Die Expression der Antikörperfragmente wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 50 µM IPTG induziert. Nach einer Produktionsphase von 3 h bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen geerntet. Mit dem Kulturüberstand wurde anschließend eine Ammoniumsulfatfällung (AS) und zusätzlich mit dem Zellpellet eine periplasmatische Präparation (PPP) durchgeführt. Die Proben der AS und der PPP wurden vereinigt und ü.N. gegen PBS dialysiert.

Die Reinigung der in den AS/PPP-Fractionen vorhandenen scFv-Fragmente erfolgte mittels IMAC im *batch*-Verfahren. Der Verlauf der Proteinreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

untersucht. Die Konzentrationen der produzierten und gereinigten anti-Crf2 scFvs wurden anschließend densitometrisch bestimmt (Daten nicht gezeigt).

6.7.2 Western Blot und Immunfärbung der gereinigten anti-Crf2 scFv-Proteine

Für die weitere Charakterisierung der isolierten anti-Crf2 scFv-Klone wurde mittels Western Blot und Immunfärbung überprüft, welcher scFv-Klon lineare Epitope des rekombinanten Crf2-Proteins bindet. Die anti-Crf2 scFv-Klone aus den Antikörperselektionen A1 und B1 banden im Western Blot lineare Epitope des rekombinanten Crf2-Proteins (Abbildung 30).

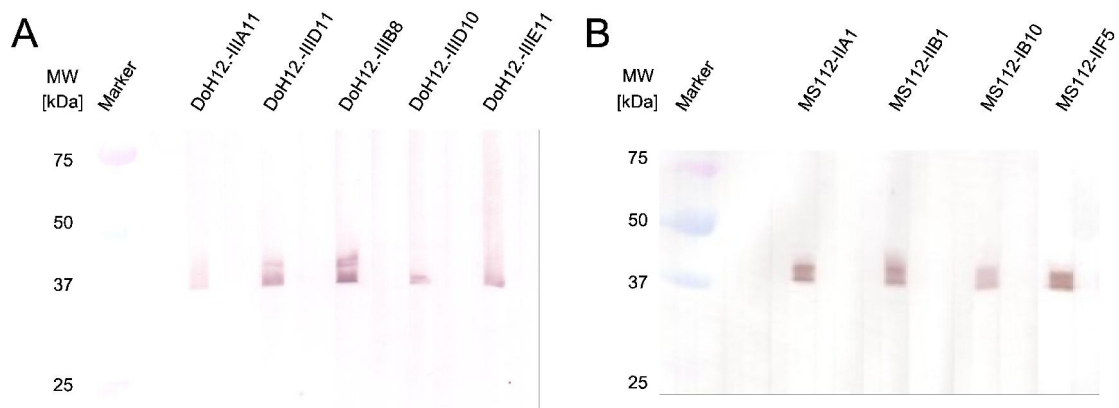


Abbildung 30: Western Blot mit Immunfärbung der anti-Crf2 scFv-Klone

Für den Western Blot mit Immunfärbung der anti-Crf2 scFv-Klone aus den Antikörpergenbibliotheken HAL 4/7 (**A**) und MAYKI (**B**) und der Antikörperselektion mit direkt immobilisiertem Crf2-Protein in Mikrotiterplatten wurden je Spur 1 µg rekombinantes Crf2-Protein in einer 12 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für den Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Jede Spur der *multiscreen*-Kammer wurde anschließend mit 2 µg/mL des jeweiligen anti-Crf2 scFv-Klons inkubiert. Der Nachweis gebundener scFvs erfolgte über einen Maus anti-c-myc-IgG 9E10 Antikörper (1:500) und ein Ziege anti-Maus-IgG (Fab-spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Substrat: NBT/BCIP

Für die anti-Crf2 scFv-Klone aus der Antikörperselektion A2 und B2 konnte keine Bindung an rekombinantes Crf2-Protein im Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

6.7.3 Test der anti-Crf2 scFv-Klone für den Crf2-capture-ELISA mit biotinyliertem Crf2-BAD-Protein

Für die serologische Diagnostik der Invasiven Aspergillose mittels Sandwich-ELISA müssen die immobilisierten anti-Crf2 Antikörper das lösliche Antigen spezifisch in geringsten Konzentrationen im Serum binden können. Hiefür wurden die anti-Crf2 scFv-Klone in einem Crf2-capture-ELISA mit löslichem biotinyliertem Crf2-BAD-Protein getestet, das zuvor in humanem Serum verdünnt wurde. Es wurden zunächst je Kavität jeweils 400 ng der anti-Crf2 scFv-Klone immobilisiert und mit biotinyliertem Antigen in einer Verdünnungsreihe von 0,1 bis 600 ng/mL inkubiert. Der Nachweis des gebundenen biotinylierten Proteins erfolgte über HRP konjugiertes Streptavidin. Als Negativkontrolle wurde der anti-OMPD scFv-Klon TM44-C7.3 verwendet. Als Nachweisgrenze wurde die Verdünnungsstufe definiert, bei dem das ELISA-Signal noch fünffach über dem der Negativkontrolle lag.

Die anti-Crf2 scFv-Klone aus der Antikörperselektion A1 banden unabhängig von der eingesetzten Konzentration kein Crf2-BAD-Protein im Serum ($A_{450nm} < 0,13$) (Daten nicht gezeigt).

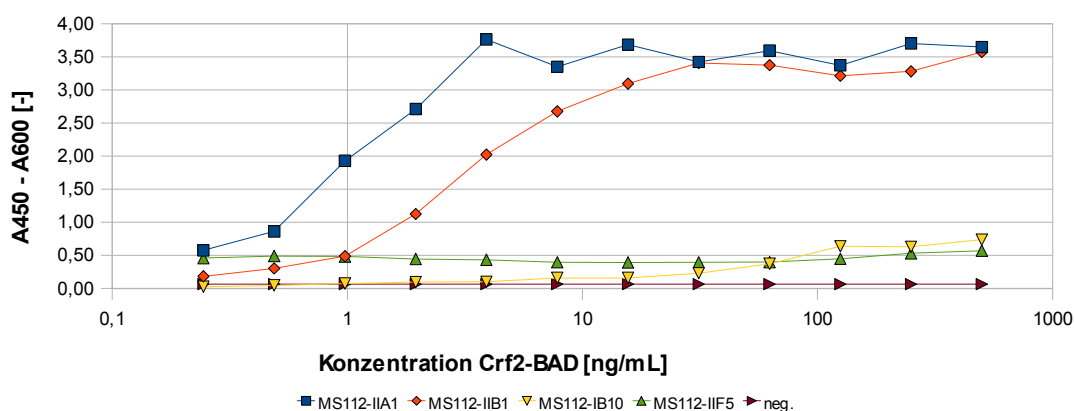


Abbildung 31: Crf2-capture-ELISA mit anti-Crf2 scFv-Klonen aus der Antikörperselektion B1

Für den Bindungsnachweis von löslichem, biotinyliertem Crf2-BAD durch immobilisierte anti-Crf2 scFv Proteine aus der Antikörperselektion B1 wurden je Kavität 400 ng anti-Crf2 scFv immobilisiert. Eine Verdünnungsreihe in humanem Serum mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein (0,1-600ng/mL) wurde mit dem jeweiligen scFv-Klon inkubiert und über Streptavidin HRP (1µg/mL) nachgewiesen. Substrat: TMB.

Von den anti-Crf2 scFv-Klonen aus der Antikörperselektion B1 band der Klon MS112-IIA1 bis 0,25 ng/mL spezifisch Crf2-BAD-Protein im Serum. Für den Klon MS112-IIB1 lag die Nachweisgrenze bei 1 ng/mL und für den Klon MS112-IB10 bei 62,5 ng/mL. Die Klone MS112-IIF5 und MS112-IH1 zeigten ein konstantes ELISA-Signal bei $A_{450nm} \approx 0,5$ bzw. $A_{450nm} < 0,1$.

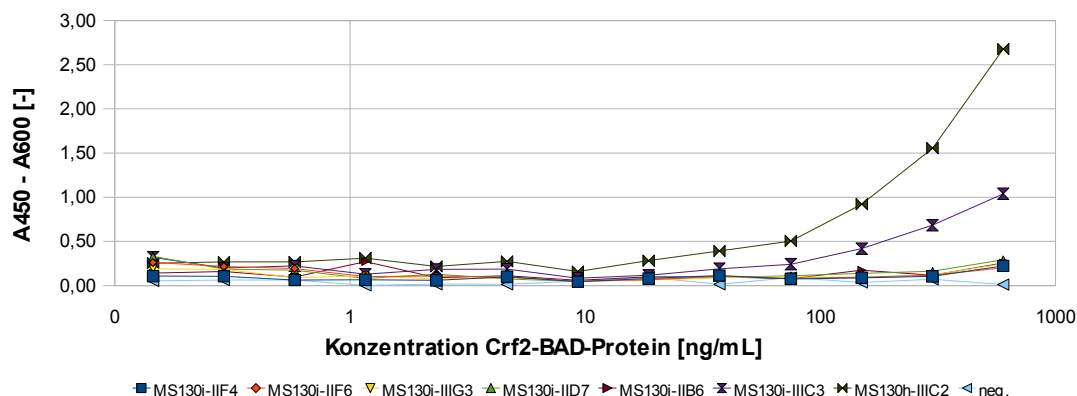


Abbildung 32: Crf2-capture-ELISA mit anti-Crf2 scFv-Klonen aus den Antikörperselektionen A2 und B2

Für den Bindungsnachweis von löslichem, biotinyliertem Crf2-BAD, durch immobilisierte anti-Crf2 scFvs Proteine aus den Antikörperselektionen A2 und B2, wurden je Kavität 400 ng anti-Crf2 scFvs immobilisiert. Eine Verdünnungsreihe in humanem Serum mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein (0,1-600 ng/mL) wurde mit dem jeweiligen scFv-Klon inkubiert und über Streptavidin HRP (1 µg/mL) nachgewiesen. Substrat: TMB.

Von den anti-Crf2 scFv-Klonen aus der Antikörperselektion A2 und B2 banden die anti-Crf2 scFv-Klone MS130h-IIIC2 und MS130i-IIIC3 das Crf2-BAD-Protein im Serum mit einem ELISA-Signal $A_{450nm} > 0,5$. Die Nachweisgrenze für diese Klone lag bei 37,25 ng/mL bzw. bei 150 ng/mL. Die ELISA-Signale der Klone MS130i-IIIG3, MS130i-IIB6, MS130i-IID7, MS130i-IIF4 und MS130i-IIF6 lagen unterhalb $A_{450nm} > 0,3$.

6.7.4 Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanzbestimmung

Die Affinität der anti-Crf2 scFv-Klone zu Crf2-Protein wurde mittels der Oberflächenplasmonresonanztechnologie (*Surface Plasmon Resonance*: SPR) in einer Biacore2000 Apparatur bestimmt. Diese markierungsfreie Methode benötigt für den kinetischen Bindungsverlauf zwischen Analyt und Liganden keine weiteren Nachweisreagenzien. Die Änderung des Brechungsindex, hervorgerufen durch Bindung der mobilen Analytenlösung (Antikörperfragment) an den immobilisierten Liganden (Crf2-Protein), führt zur Änderung der Oberflächenplasmonresonanz und wird in Echtzeit als Resonanzeinheit (RU) gemessen. Das Antigen Crf2 und das Referenzprotein BSA (Bovines Serumalbumin) wurden jeweils mit einer $RU_{max} \approx 200$ über eine Aminkopplung auf einem CM5-Chip immobilisiert. Die Gleichgewichtskonstante (K_D) wurde über die Bindungskinetik eines anti-Crf2 scFv-Klons an das Crf2-Protein ermittelt.

Die zu analysierenden anti-Crf2 scFv-Klone wurden in PBS-T (0,005 % Tween 20) in einer

Konzentration zwischen 2,5 nM und 400 nM verdünnt und durch die Messzellen geleitet. Die Assoziationszeit für jede Verdünnung betrug 300 s und die Dissoziationszeit 600 s. Um Puffereffekte und unspezifische Wechselwirkungen zwischen Probe und Messzelle zu kompensieren, wurden die Messergebnisse der Referenzmesszelle von denen der Crf2-Messzelle subtrahiert. Die Bestimmung der Bindungsparameter für alle anti-Crf2 scFv-Klone erfolgte auf der Grundlage des mathematischen Modells von Langmuir (1:1) mit getrennt berechneter Assoziationskonstante K_A und Dissoziationskonstante K_D .

Alle scFv-Klone aus der Antikörperselektion A1 banden nicht auf einem CM5 Chip gekoppeltes Crf2-Protein (Daten nicht gezeigt). Für diese scFvs konnten keine Bindungsparameter mittels SPR bestimmt werden. Hingegen konnten die Bindungsparameter für die scFv-Klone aus der Antikörpergenbibliothek MAYKI und für den Klon MS130h-IIIC2 (A2) mittels SPR analysiert werden. Die Affinitäten für die Klone aus der Immunbibliothek MAYKI variierten zwischen $4,1 \cdot 10^{-7}$ und $3,9 \cdot 10^{-10}$ [M] (Tabelle 16). Die Affinität des Klons MS130h-IIIC2 lag bei $1,35 \cdot 10^{-8}$ [M], während die scFv-Klone MS112-IIB1 und MS130i-IIIC3 eine Affinität im subnanomolaren Bereich besaßen. Die Qualität der berechneten Bindungsparameter wurde über das χ^2 ermittelt und lag bei <1% des RU_{max} -Wertes. Die resultierenden Sensogramme sind exemplarisch für die Antikörperfragmente MS112-IIB1 und MS130-IIIG3 in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellt.

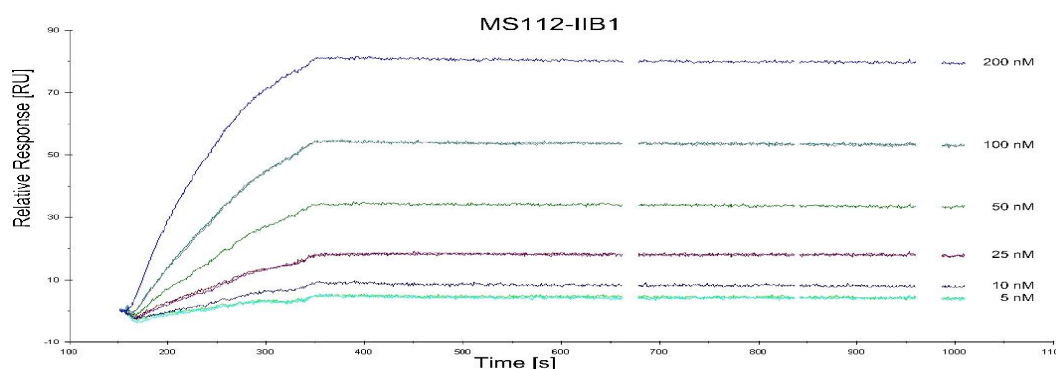


Abbildung 33: Oberflächenplasmonresonanzanalyse für den scFv-Klon MS112-IIB1

Darstellung des Sensogramms für MS112-IIB1 auf ≈ 200 RU Crf2-Protein. Die Bestimmung der Bindungsparameter erfolgte nach dem mathematischen Modell Langmuirs (1:1, separat). Die Konzentrationen 5, 25 und 100 nM wurden als Duplikat vermessen. Zur Regeneration der Messzelle wurde 100 mM Glycin pH 2,5 verwendet.

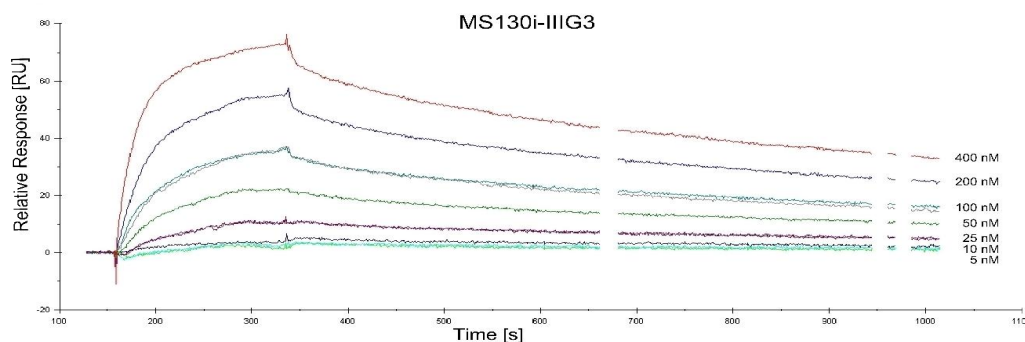


Abbildung 34: Oberflächenplasmonresonanzanalyse für den scFv-Klon MS130i-IIIIG3

Darstellung des Sensogramms für MS130i-IIIIG3 auf ≈ 200 RU Crf2-Protein. Die Bestimmung der Bindungsparameter erfolgte nach dem mathematischen Modell Langmuirs (1:1, separat). Die Konzentrationen 5, 25 und 100 nM wurden als Duplikat vermessen. Zur Regeneration der Messzelle wurde 100 mM Glycin pH 2,5 verwendet.

Tabelle 16: Bestimmung der Bindungsparameter von anti-Crf2 scFv-Klonen zum rekombinanten Crf2 Protein

CM5-Chip – 200 RU Crf2

Antikörper-selektion	Klonname	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	R_{max} [RU]	K_A [1/M]	K_D [M]	χ^2
MAYKI in MTP	MS112-IIA1	$1,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^3$	18,5	$8,15 \cdot 10^8$	$1,01 \cdot 10^{-8}$	0,15
	MS112-IIB1	$4,77 \cdot 10^5$	$8,24 \cdot 10^5$	50,2	$4,16 \cdot 10^9$	$3,93 \cdot 10^{-10}$	0,17
	MS112-IIF5	$9,32 \cdot 10^4$	$9,32 \cdot 10^4$	96,33	$1,53 \cdot 10^{-8}$	$1,22 \cdot 10^{-8}$	0,24
	MS112-IB10	$1,06 \cdot 10^4$	$7,61 \cdot 10^4$	23,15	$5,81 \cdot 10^7$	$7,68 \cdot 10^{-8}$	0,14
HAL 4/7 in Lösung	MS130h-IIIC2	$1,54 \cdot 10^5$	$1,42 \cdot 10^3$	55,51	$1,16 \cdot 10^8$	$1,35 \cdot 10^{-8}$	0,41
MAYKI in Lösung	MS130i-IIIC3	$2,33 \cdot 10^5$	$1,42 \cdot 10^4$	64,82	$1,71 \cdot 10^9$	$9,58 \cdot 10^{-10}$	0,32
	MS130i-IIIIG3	$1,10 \cdot 10^6$	$9,71 \cdot 10^4$	20,16	$1,13 \cdot 10^9$	$4,06 \cdot 10^{-9}$	0,3
	MS130i-IIB6	$5,76 \cdot 10^4$	$2,16 \cdot 10^3$	21,82	$2,95 \cdot 10^7$	$2,45 \cdot 10^{-7}$	0,53
	MS130i-IID7	$4,65 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^3$	50,4	$4,56 \cdot 10^7$	$5,35 \cdot 10^{-8}$	0,56
	MS130i-IIF6	$1,09 \cdot 10^6$	$1,44 \cdot 10^3$	18,5	$8,15 \cdot 10^8$	$1,01 \cdot 10^{-8}$	0,15
	MS130i-IIF4	$2,83 \cdot 10^5$	$1,01 \cdot 10^3$	27,53	$3,77 \cdot 10^8$	$4,14 \cdot 10^{-7}$	0,14

k_a : Assoziationsrate

K_A : Gleichgewichts-Assoziationskonstante

R_U : Resonanz Unit

K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

k_d : Dissoziationsrate

χ^2 : Gütemaß der Messungen

6.7.5 Stabilitätstest der anti-Crf2 scFv-Klone

Die Stabilität der ausgewählten anti-Crf2 scFv-Klone (Tabelle 17), nach Inkubation in PBS und humanem Serum wurde in einem ELISA funktionell überprüft. Um Effekte des Serumkomplements auszuschließen, erfolgte eine Inkubation der scFvs in hitzeinaktiviertem und nicht-hitzeinaktiviertem Serum. Von jedem Klon wurde jeweils im Triplikat ein Aliquot mit der scFv-Konzentration 5 µg/mL in PBS oder humanem Serum erstellt und bei -80 °C gelagert. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurde von jedem Klon eine Probe zu definierten Zeitpunkten entnommen und bei 37 °C gelagert. Nach vier Wochen wurde die Funktionalität der jeweiligen scFv-Proteine in einem Antigen-ELISA auf 200 ng Crf2-BAD-Protein, das in Streptavidin-Mikrotiterplatten immobilisiert war, überprüft. Die Proben vom Tag 0 des jeweiligen Klons mit dem höchsten absoluten ELISA-Signal dienten als Referenzwert für die Bestimmung der prozentualen Funktionalität über die Zeit. Als funktionelle Stabilität wurde der Zeitraum, bei dem noch 50 % des Referenz-ELISA-Signals zu messen war, definiert.

Die Stabilität der Klone innerhalb der vier Wochen unterschied sich sowohl untereinander, als auch zwischen den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

Während der Inkubation bei 37 °C in PBS verloren nach dem ersten Tag die Hälfte der Klone 50 % ihrer Funktionalität. Lediglich die Klone MS130i-IID7 und MS130i-IIF4 waren nach 3 Tagen und der Klon MS130h-IIIC2 war nach vier Wochen zu 50 % im Antigen-ELISA funktional (Abbildung 35A und Tabelle 17).

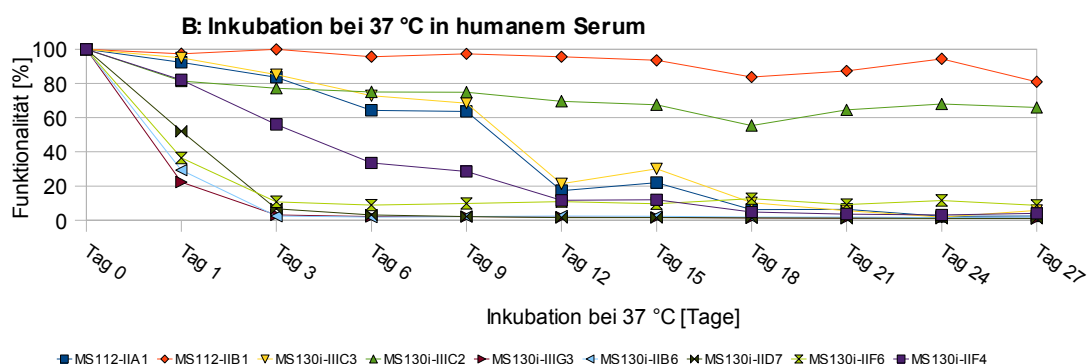
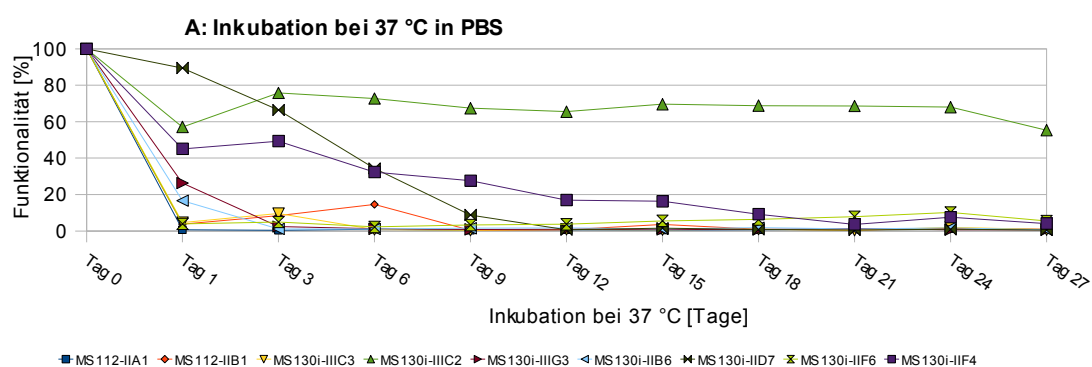
Während der Inkubation bei 37 °C im humanen Serum hatten die Klone MS112-IIB1 und MS130h-IIIC2 nach vier Wochen im Antigen-ELISA eine Funktionalität von über 50 %. Die Klone MS130h-IIIC3 und MS112-IIA1 waren lediglich bis 9 Tage und der Klon MS130h-IIIF4 bis 3 Tage im Antigen-ELISA zu 50 % funktional. Die anderen Klone banden nach einem Tag Inkubation im Serum bei 37 °C nicht mehr das Antigen (Abbildung 35B und Tabelle 17).

Wurden die anti-Crf2 Klone in hitzeinaktiviertem Serum bei 37 °C gelagert war ihre Funktionalität im Antigen-ELISA, mit Ausnahme des Klons MS112-IIA1, mit der Lagerung in naivem humanem Serum identisch (Abbildung 35C und Tabelle 17). Einen Einfluß des Serum-Komplements auf die Stabilität der zu untersuchenden scFv-Klone war nicht zu erkennen. In Tabelle 17 sind Stabilitäten in Abhängigkeit der Inkubationsbedingung für die ausgewählten anti-Crf2 scFv-Klone zusammengefasst.

Tabelle 17: Übersicht der Stabilität der anti-Crf2 scFv-Klone

Die Stabilität der scFv-Klone wurde über ihre Funktionalität in einem Antigen-ELISA für den Zeitraum von vier Wochen Inkubation in PBS oder humanem Serum bei 37 °C ermittelt. Für jeden Klon wurde der Zeitraum bestimmt, bei dem er noch 50 % seiner ursprünglichen Funktionalität besaß.

Antikörperselektion	Klonname	Stabilität in Tagen bei 37 °C Lagerung in:		
		PBS	humanem Serum	hitzeinaktiviertem, humanem Serum
MAYKI in MTP	MS112-IIA1	1	9	6
	MS112-IIB1	1	27	27
HAL 4/7 in Lösung	MS130h-IIIC2	27	27	27
	MS130i-IIIC3	1	9	9
	MS130i-IIIG3	1	1	1
MAYKI in Lösung	MS130i-IIB6	1	1	1
	MS130i-IID7	3	1	1
	MS130i-IIF6	1	1	1
	MS130i-IIF4	3	3	3



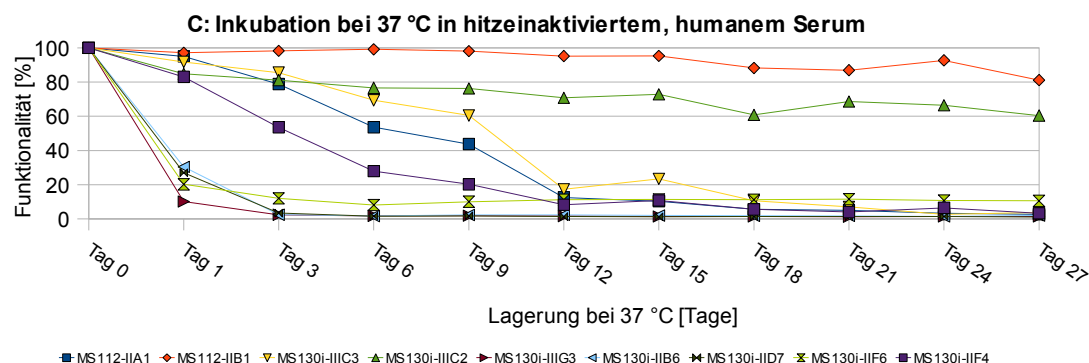


Abbildung 35: Stabilitätsanalyse der anti-Crf2 scFv-Klone mittels Antigen-ELISA

Es wurden 400 ng Crf2-BAD-Protein je Kavität der Streptavidin-Mikrotiterplatte immobilisiert. Die verwendeten anti-Crf2 scFv-Klone waren von 0 bis 27 Tagen bei 37 °C in PBS (A), humanem Serum (B) oder hitzeinaktiviertem, humanem Serum (C) inkubiert. Die Proben vom Tag 0 des jeweiligen Klons dienten als Referenzwert (100 %) für die Bestimmung der prozentualen Funktionalität über die Zeit. Der Nachweis bindender scFvs erfolgte über einen Maus anti-myc 9E10 (1:1.000) Antikörper und einem Ziege anti-Maus IgG HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

6.8 Klonierung, Produktion und Reinigung der anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden anti-Crf2 Klone vom scFv-Format in scFv-Fc-Konstrukte überführt, da dieses Format einen Aviditätseffekt ermöglicht und einfach über das Fc-Fragment mit FITC-konjugierten Nachweisantikörpern zu detektieren ist.

Für die Produktion von anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen wurden die anti-Crf2 scFv-Genfragmente DoH12.2-IIIA11, DoH12.2-IIID11, DoH12.2-IIIB8, DoH12.2-IIID10, DoH12.2-IIIE11 und MS130h-IIIC2 aus der naiven humanen Antikörpergenbibliothek HAL4/7 sowie die scFv-Genfragmente MS112-IIA1, MS112-IIB1, MS112-IB10, MS130i-IIIC3, MS130i-IIIG3, MS130i-IIB6, MS130i-IID7 aus der Immunbibliothek MAYKI über die Schnittstellen *NotI* und *NcoI* in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-hIgG1-Fc-XP kloniert und anschließend mittels DNA-Sequenzierung validiert.

Eukaryotische HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und die scFv-Fc-Fusionsproteine produziert.

Nach der Reinigung der produzierten anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine mittels Protein A Affinitätschromatographie wurden die einzelnen Konzentrationen densitometrisch bestimmt (Daten nicht gezeigt).

6.9 Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen

Für diagnostische und therapeutische Anwendungen müssen anti-Crf2 Antikörper das Antigen auf der Hypho- oder Sporenoberfläche von *A. fumigatus* spezifisch binden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Bindung ausgewählter anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine auf *Aspergillus spp.* und *C. albicans* untersucht. Es wurde für jeden Pilz zuvor 4 mL RPMI 1640 Medium mit $5 \cdot 10^4$ Sporen inokuliert und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die auskeimenden Sporen und Hyphen für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Als Positivkontrolle wurde das Serum einer Crf2-immunisierten Maus eingesetzt (Daten nicht gezeigt) und als Negativkontrollen scFv Fc-Fusionsproteine, die nicht spezifisch für *A. fumigatus* waren. Die anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine wurden jeweils mit der Konzentration von 2 µg/mL für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Detektion erfolgte über einen FITC konjugierten Antikörper, der gegen das humane Fc-Fragment gerichtet war. Alle Mikroskopieaufnahmen erfolgten sowohl im Hellfeld als auch mit einem Fluoreszenzfilter (FITC).

Zunächst wurden die anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine DoH12.2-III A11, DoH12.2-IIID11, DoH12.2-IIIB8, DoH12.2-IIID10, DoH12.2-IIIE11 für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit *A. fumigatus* verwendet. Diese Klone erkannten im Crf2-capture-ELISA rekombinantes Crf2-BAD-Protein nicht, hätten jedoch natives, zellwandassoziiertes Antigen anderer Konformation auf *A. fumigatus* binden können.

Keiner dieser anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine färbte in der Fluoreszenzmikroskopie spezifisch das Antigen auf Sporen oder Hyphen von *A. fumigatus* indirekt an (Abbildung 36,A). Diese Klone wurden nicht mehr für den Kreuzreaktionen auf anderen Pilzen verwendet.

Von den anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen MS112-IIA1, MS112-IIB1 (Abbildung 36, B), MS112-IB10, MS130h-IIIC2 (Abbildung 36,C), MS130i-IIIC3 (Abbildung 36,D), MS130i-IIIG3, MS130i-IIB6, MS130i-IID7 (Daten im Anhang) färbten alle Klone mit Ausnahme des Klons MS112-IB10 spezifisch basal und apikal die Zellwände von *A. fumigatus* indirekt an. Die Farbtintensität war besonders in den Bereichen des aktiven Wachstums, d. h. in den Hyphenspitzen und den auskeimenden Bereichen ausgeprägt, während die ruhenden Sporen keine Färbung aufwiesen. Die Intensität der fluoreszierenden Regionen war bei diesen Klonen, trotz gleicher Konzentration (2 µg/mL), unterschiedlich. Die in das scFv-Fc-Format überführten anti-Crf2 Klone aus der Antikörperselektion B1 färbten die Zellwand des Pilzes gleichmäßig, durchgehend und intensiv indirekt an. Die scFv-Fc-Fusionsproteine aus der Antikörperselektion B2 und A2 banden spezifisch ihr

Antigen auf Hyphen von *A. fumigatus*, aber mit geringerer Intensität und ungleichmäßiger als die scFv-Fc-Fusionsproteine aus der Antikörperselektion B1.

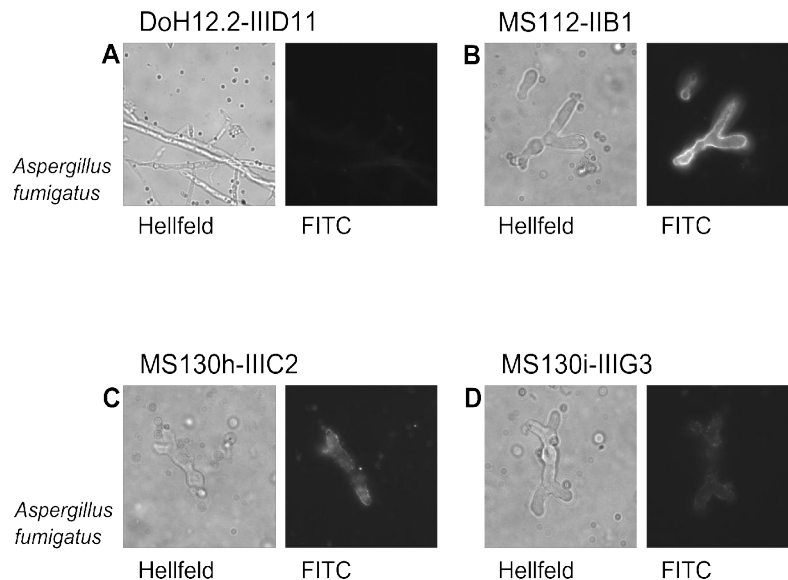


Abbildung 36: Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen auf *A. fumigatus*

Indirekte Immunfärbung mit scFv-Fc-Fusionsproteinen auf auskeimenden Sporen und Hyphen von *A. fumigatus*. Die Mikroskopieaufnahmen erfolgten im Hellfeld und mit Fluoreszenzfilter (FITC). Der Klon DoH12.2-IIID11 (A) wurde aus der Antikörperselektion A1 und der Klon MS112-IIB1 (B) aus B1 isoliert. Die Klone MS130h-IIIC2 (HAL 4/7) (C) und MS130i-IIIG3 (MAYKI) (D) waren hingegen aus der Antikörperselektion A2 und B2. Der Nachweis gebundener scFv-Fc-Fusionsproteine erfolgte über den FITC konjugierten Antikörper Ziege-anti-Mensch (Fc spez.) (1:500) ALEXA 488.

Um die Spezifität der auf *A. fumigatus* bindenden anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine MS112-IIA1, MS112-IIB1, MS130h-IIIC2, MS130i-IIIC3, MS130i-IIIG3, MS130i-IIB6 und MS130i-IID7 und die Artspezifität der Glykosyhydrolase Crf2 zu überprüfen, wurden diese Klone in der Immunfluoreszenzmikroskopie auf Kreuzreaktion mit den humanpathogenen Pilzen *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* und *C. albicans* untersucht.

Keines der eingesetzten anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteine hat spezifisch die Zellwand oder Sporen der untersuchten Pilze gebunden (Abbildung 37). Es gab kein spezifisches Färbemuster an den Hyphen oder in den Wachstumszonen. Die Färbung der Sporen war ebenso unspezifisch. Die isolierten anti-Crf2 Antikörperfragmente aus den Antikörperselektionen A2, B1 und B2 waren in der Fluoreszenzmikroskopie nur spezifisch für *A. fumigatus*.

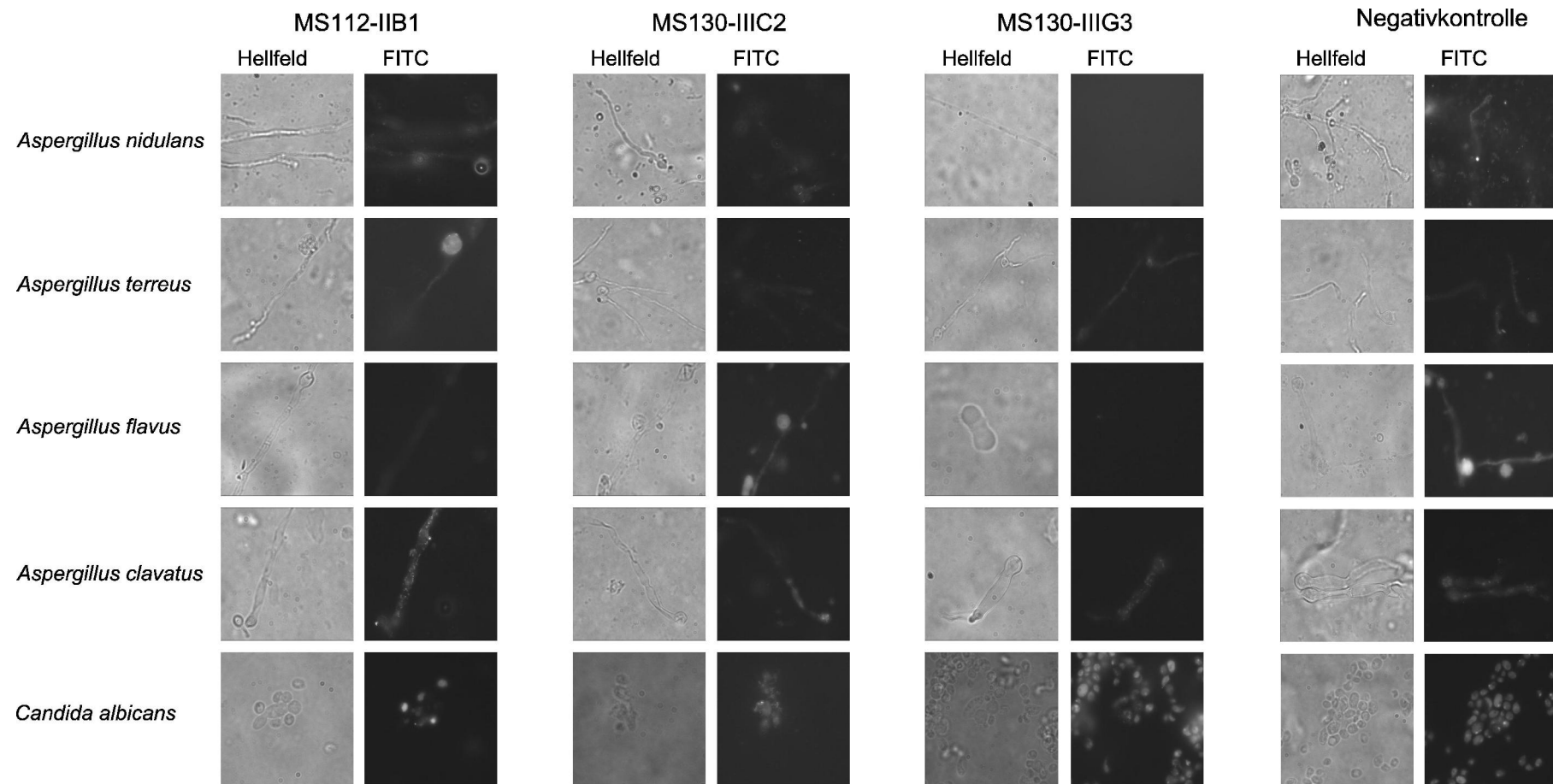


Abbildung 37: Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen für einen Kreuzreaktionstest auf *Aspergillus spp.* und *C. albicans*

Indirekte Immunfärbung mit anti-Crf2 scFv-Fc-Fusionsproteinen auf auskeimenden Sporen und Hyphen des *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* und *C. albicans*. Die Mikroskopieaufnahmen für den Nachweis von Kreuzreaktionen mit den Pilzen erfolgte im Hellfeld und mit einem Fluoreszenzfilter (FITC). Der Klon MS112-IIB1 wurde aus der Antikörperselektion B1, der Klon MS130h-IIIC2 aus der Antikörperselektion A2 und der Klon MS130i-IIIG3 aus der Antikörperselektion B2 isoliert. Als Negativkontrolle wurde das anti-CD30 hIgG1 scFv-Fc-Fusionsprotein MS152-CM48 verwendet. Der Nachweis gebundener scFv-Fc-Fusionsproteine erfolgte über den FITC konjugierten Antikörper Ziege-anti-Mensch (Fc spez.) (1:500) ALEXA 488.

6.10 Zusammenfassung der Eigenschaften der charakterisierten anti-Crf2 Antikörperfragmente

Tabelle 18: Zusammenfassung der Analysenergebnisse für die isolierten anti-Crf2 Antikörperfragmente.

Antikörpergenbibliothek	Klonname	Antikörperselektion in	Lineares Epitop †	Konformationelles Epitop †	Nachweisgrenze [ng/mL] †	Crf2-Epitop *	Fluoreszenzmikroskopie*						Affinität K_D [M] †
							A. <i>fumigatus</i>	A. <i>nidulans</i>	A. <i>terreus</i>	A. <i>flavus</i>	A. <i>clavatus</i>	C. <i>albicans</i>	
HAL 4/7	DoH12.2-III A1	Mikrotiterplatte	+	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
HAL 4/7	DoH12.2-IIIB8	Mikrotiterplatte	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
HAL 4/7	DoH12.2-IIID10	Mikrotiterplatte	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
HAL 4/7	DoH12.2-IIID11	Mikrotiterplatte	+	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
HAL 4/7	DoH12.2-IIIE11	Mikrotiterplatte	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
HAL 4/7	MS130i-IIIC2	Lösung	-	+	37,25	-	++	-	-	-	-	-	$1,35 \cdot 10^{-8}$
MAYKI	MS112-IIA1	Mikrotiterplatte	+	-	0,25	DISSSSSVTSSTTST	+++	-	-	-	-	-	$1,51 \cdot 10^{-9}$
MAYKI	MS112-IIB1	Mikrotiterplatte	+	-	1	GTRFPQTPMRLRL GPYTMVYKSVRIEN	+++	-	-	-	-	-	$3,93 \cdot 10^{-10}$
MAYKI	MS112-IB10	Mikrotiterplatte	+	-	62,5	-	-	-	-	-	-	-	$7,64 \cdot 10^{-8}$
MAYKI	MS112-IIF5	Mikrotiterplatte	+	-	>600	n.d.	-	-	-	-	-	-	$1,22 \cdot 10^{-8}$
MAYKI	MS130h-IIIC3	Lösung	-	+	150	n.d.	+	-	-	-	-	-	$9,58 \cdot 10^{-10}$
MAYKI	MS130h-IIIG3	Lösung	-	+	>600	n.d.	+	-	-	-	-	-	$4,06 \cdot 10^{-9}$
MAYKI	MS130h-IIB6	Lösung	-	+	>600	-	+	-	-	-	-	-	$2,45 \cdot 10^{-7}$
MAYKI	MS130h-IID7	Lösung	-	+	>600	-	++	-	-	-	-	-	$5,35 \cdot 10^{-8}$
MAYKI	MS130h-IIF6	Lösung	-	+	>600	n.d.	-	-	-	-	-	-	$1,01 \cdot 10^{-8}$
MAYKI	MS130h-IIF4	Lösung	-	+	>600	n.d.	-	-	-	-	-	-	$4,14 \cdot 10^{-7}$

n.d.: Nicht durchgeführter Versuch mit dem Antikörperfragment *: Verwendetes Antikörper-Format: scFv-Fc-Fusionsprotein

+: Bindung des Antikörperfragments an das Crf2-Protein †: Verwendetes Antikörper-Format: scFv

-: Keine Bindung des Antikörperfragments an das Crf2-Protein

7 Diskussion

Die Invasive Aspergillose (IA) ist eine systemische Mykose, die hauptsächlich durch den humanpathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* verursacht wird und oft zum Tod der betroffenen Personen führt. In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Zahl invasiver Aspergillosen durch die gleichzeitig zunehmende Anzahl an immunsupprimierten oder immungeschwächten Patienten mit langandauernder Neutropenie erheblich zugenommen. Gegenwärtig existiert weder ein frühzeitiges und eindeutiges Nachweisverfahren für die IA noch eine alternative Therapieform zu den kostenintensiven und nebenwirkungsreichen Antimykotika [1,39,52,120]. Es besteht daher sowohl ein dringender Bedarf an neuen diagnostischen Markern und Nachweisverfahren, als auch an alternativen Therapieformen wie Vakzinen für eine aktive Immunisierung oder Antikörpern für eine passive Immunisierung. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen versucht, einen neuen artspezifischen diagnostischen Marker für die IA zu isolieren und zu charakterisieren, und zum anderen entsprechende rekombinante Antikörper zur Diagnostik und Therapie der IA zu generieren. Zunächst wurde die neu entdeckte artspezifische Glykosylhydrolase Crf2 von *A. fumigatus* charakterisiert und anschließend für die aktive Immunisierung gegen eine IA im Mausmodell verwendet. Anschließend wurden mittels Phagen-Display-Technologie aus einer humanen, naiven Antikörperbibliothek sowie aus einer neu generierten anti-Crf2 Immunbibliothek rekombinante anti-Crf2 Antikörper isoliert und für potentielle diagnostische und therapeutische Anwendungen charakterisiert.

7.1 Isolation der neuen Glykosylhydrolasen-Variante Crf2 von *Aspergillus fumigatus*

Die artspezifischen Glykosylhydrolasen von *A. fumigatus*, insbesondere die vom *crf1*-Gen kodierten Varianten Asp f9, Asp f16 und Crf eignen sich besonders für die Diagnostik und die Therapie der IA. Sie sind über einen GPI-Anker mit der Zellwand von *A. fumigatus* verbunden, aktiv an der Zellwandsynthese des Pilzes beteiligt und werden ins umgebende Milieu abgegeben [111,112,74,73]. Sie eignen sich daher sowohl als zellwandassoziiertes *Target* für Antikörper in der Therapie als auch als löslicher diagnostischer Marker im Serum. Des Weiteren wirken sie immunogen und wurden bereits als rekombinantes Vakzin in mehreren aktiven Immunisierungen verwendet [110,59-61].

In dieser Arbeit wurde versucht, die cDNA von *asp f9*, *asp f16* und *crf1* mittels einer RT-PCR aus der mRNA eines Patientenisolats zu synthetisieren und mittels *nested*-PCR zu amplifizieren. Trotz

spezifischer Primer konnten die cDNA-Sequenzen von *aspf16* und *crf1* nicht isoliert werden. Dagegen wurde neben der cDNA von *aspf9* eine neue Variante isoliert, die aufgrund ihrer 99 %igen Sequenzhomologie vom *crf1*-Gen kodiert sein muss und deshalb als *crf2* bezeichnet wurde.

Obwohl beide Gene vom selben *open reading frame* (ORF) kodiert werden, ergab die DNA-Sequenzanalyse der isolierten cDNAs für die Gensequenz des isolierten *aspf9*-Transkripts an Position 818 und für die der neuen Variante *crf2* an den Positionen 697, 700 und 795 Sequenzabweichungen zueinander. Die unterschiedlichen Punktmutationen beruhen wahrscheinlich auf einer Mischinfektion des Patienten mit zwei unterschiedlichen *A. fumigatus*-Stämmen und damit auch auf zwei verschiedenen mRNA-Quellen oder auf einer Mutation des Infektionsstammes. Andernfalls wäre nur eine Sequenz isoliert worden. In einem multiplen Sequenz-*Alignment* zeigte sich zudem, dass bei der cDNA des *crf2*-Transkripts die Nukleotidsequenz von Position 1096→1282, verglichen mit dem bekannten *crf1*-Gen, fehlte. Das neuentdeckte *crf2*-Transkript könnte auf einer bisher unbekannten posttranskriptionalen Modifikation des *crf*-Transkripts beruhen, jedoch ist eine Mischinfektion mit unbekannten *A. fumigatus* Stämmen wahrscheinlicher, da bereits eine hohe genetische Diversität für diverse *Aspergillus* Isolate in Kliniken beschrieben wurde [6]. Ob das *crf*-Gen im Infektionsstamm verändert vorlag, konnte nicht bestätigt werden, da keine Genomanalyse aus diesem Patientenmaterial vorlag. Ein weiterer Nachweis der genetischen Diversität von *A. fumigatus* ist, dass nach seiner Genomanalyse ≈700 bekannte Gensequenzen nicht dem sequenzierten *Aspergillus*-Stamm Af293 zugeordnet werden konnten bzw. sie von anderen bekannten Stämmen stark abwichen [68].

7.2 Aktive Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein

Durch die aktive Immunisierung von Versuchstieren mit rekombinantem Crf2-Protein sollte das neue Antigen hinsichtlich seiner Immunogenität überprüft werden. Das Crf2-Protein weist über weite Teile eine identische Sequenz zu Asp f16 auf und sollte daher ähnliche immunogene Eigenschaften wie das Antigen Asp f16 besitzen. In aktiven Immunisierungen wurde das Antigen Asp f16 verwendet und dabei wurde sowohl eine spezifische T_H1 T-Zellantwort als auch eine spezifische Antikörperproduktion festgestellt. Die immunogenen Epitope des Proteins wurden mit den spezifischen Antikörpern bislang nicht bestimmt und es wurde nicht geklärt, ob es sich um eine zelluläre oder adaptive Immunität handelte. Durch spezifische Antikörper aus der aktiven Immunisierung mit dem Crf2-Protein könnten in einer Epitop-Kartierung die immunogenen Epitope der neuen Glykosylhydrolasen-Variante bestimmt werden.

Die aktive Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein und PBS erfolgte in zwei Zehnergruppen C75/B6 Mäusen. Sämtliche Mäuse der Crf2-immunisierten Gruppe überlebten eine Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* nach sieben Tagen. Hingegen überlebten aus der PBS-Kontrollgruppe nur zwei Mäuse die Infektion. Dieses Ergebnis entsprach der protektiven Wirkung, die bereits für die Immunisierung mit dem homologen Asp f16-Protein beschrieben wurde [59]. Für den Nachweis, ob das rekombinante Crf2-Protein eine antigenspezifische Antikörperproduktion auslöst, wurden zunächst die Seren der Mäuse in einem sensitiven und hochspezifischen *Bridging*-ELISA auf das Vorhandensein von anti-Crf2 Antikörpern überprüft [121-123]. Sowohl die Immunisierung der Mausgruppe 1 mit rekombinantem Crf2-Protein als auch die Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe führte zu einer spezifischen anti-Crf2 Antikörperproduktion. Der *Bridging*-ELISA ermöglicht einen sensitiven Nachweis von Serumantikörpern, jedoch ist eine diagnostische Differenzierung, ob es sich beispielsweise um IgE-Antikörper oder um IgG-Antikörper handelt nicht möglich [124].

Im Antigen-ELISA wurde für die Crf2-immunisierten Mäuse (Tag 0) ein anti-Crf2 IgG-Antikörpertiter von 1:256.000 nachgewiesen, so dass eine adaptive Immunität als Ursache für die Protektion gegen die Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* wahrscheinlich war. Interessanterweise wurde für die überlebende Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe bereits sieben Tage nach der Infektion mit den Sporen ein anti-Crf2 Antikörpertiter nachgewiesen, der ähnlich hoch wie bei den Crf2-immunisierten Mäusen war. Bisherige Untersuchungen bei Menschen zeigten, dass die IgG-Antikörperbildung bei immunsupprimierten Patienten durchschnittlich erst 10 Tage nach der Diagnosestellung der IA einsetzte [124].

Ob es sich bei einer Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* um eine rein humorale oder zelluläre Protektion handelt, konnte anhand des *Bridging*- und des Antigen-ELISAs nicht aufgeklärt werden. Es konnte jedoch durch den Nachweis der anti-Crf2 Serumantikörper eine spezifische B-Zell-Antwort in Mäusen auf eine Immunisierung mit Crf2-Protein oder eine Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* gezeigt werden. Für das Antigen Crf2 konnte nachgewiesen werden, dass es hochimmunogen ist und eine protektive Wirkung besitzt.

Der Tatsache, dass die Maus 4 aus der PBS-Kontrollgruppe, trotz eines geringen anti-Crf2 IgG-Antikörpertiters, eine Infektion überlebte, könnten mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Bei einer unzureichenden Immunsuppression könnten die Sporen über eine T_H1 T-Zellantwort, welche Makrophagen und Neutrophile aktiviert, eliminiert worden sein, bevor sie metabolisch aktiv wirken konnten [125,126,12,127]. Auskeimende Sporen führen hingegen zu einer T_H2 T-Zellantwort mit einer

spezifischen Antikörperproduktion [128-130]. Da anti-Crf2 Antikörper nicht nachgewiesen werden konnten, schienen demnach keine Sporen ausgekeimt zu sein. Infektionsversuche sind zudem im Tiermodell schwer zu standardisieren und könnten nicht für alle Mäuse in diesem Versuch identisch gewesen sein.

Nachdem eine spezifische anti-Crf2 Antikörperproduktion im *Bridging*-ELISA nachgewiesen werden konnte, sollte in einem Western Blot untersucht werden, ob die gebildeten anti-Crf2 Serumantikörper auch lineare Epitope des rekombinanten Crf2-Proteins binden.

Sowohl das Serum (Tag +7) der überlebenden Maus 10 aus der PBS-immunisierten Kontrollgruppe als auch die Seren (Tag 0, Tag +7) aus der Crf2-immunisierten Mausgruppe enthielten Antikörper, die an lineare Epitope des rekombinanten Crf2-Proteins banden. Das rekombinante als auch das zellwandassoziierte Crf2 enthält demnach lineare immunogene Epitope, gegen die anti-Crf2 Antikörper gerichtet sind.

Um das Crf2-Protein als diagnostischen Marker oder als therapeutisches *Target* weiter zu charakterisieren, war es von Bedeutung, an welchen Stellen das Antigen auf der Zellwand lokalisiert ist und ab welcher Wachstumsphase des Pilzes es frühestens nachzuweisen ist.

Mit den anti-Crf2-Serumantikörpern aus der Crf2-immunisierten Mausgruppe wurden vor allem in Bereichen aktiven Wachstums die Hyphen von *A. fumigatus* basal und apikal spezifisch angefärbt. Die Bindung an die Zellwand erfolgte ab dem Zeitpunkt des isotropischen Wachstums der Spore, d. h. direkt nach dem Auskeimen. Ruhende Sporen wurden hingegen nicht angefärbt. Mit anti- β Glukan-Serumantikörpern konnte bisher *A. fumigatus* ebenso spezifisch gebunden werden. Die Unterscheidung zwischen einer ruhenden und einer auskeimenden Spore war mit diesen Antikörpern hingegen nicht möglich, da diese gegen Glukan gerichtet waren, welches stets auf ruhenden Sporen vorhanden ist [64]. Die indirekte Färbung einer auskeimenden Spore wäre somit der früheste Zeitpunkt zur Diagnose einer möglichen IA und ist mit diesem Antigen als diagnostischen Marker möglich. Ein Grund, dass ruhende Sporen nicht angefärbt wurden, wäre, dass die Glykosylhydrolasen wegen ihrer aktiven Beteiligung an der Morphogenese von Pilzen erst unmittelbar nach deren Auskeimen nachweisbar sind [111,112,131,132,69]. Die Bedeutung der Glykosylhydrolase an der Morphogenese des Pilzes lässt sich auch anhand des Färbemusters auf den Hyphen bestätigen, da nur in Bereichen aktiven Wachstums eine indirekte Färbung erfolgte.

Da die anti-Crf2 Serumantikörper vom Tag 0 der Crf2-immunisierten Gruppe 1 sowohl rekombinantes als auch zellwandassoziiertes Antigen banden, wurde die Vermutung einer Strukturhomologie zwischen dem rekombinanten Crf2-Antigen und dem zellwandassoziierten nativen Antigen bestätigt.

Demnach könnten auch rekombinante anti-Crf2 Antikörper, die auf rekombinantem Crf2-Protein isoliert werden, natives Antigen auf der Zellwand binden. Diese Antikörper wären daher für die Diagnostik und Therapie der IA geeignet.

Mit den Serumantikörpern der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe konnte ein identisches Färbemuster auf den Hyphen oder auskeimenden Sporen von *A. fumigatus* wie mit den Seren der Crf2-immunisierten Mäuse nachgewiesen werden. Demnach binden die Serumantikörper der Maus 10 vermutlich an das gleiche Antigen auf der Hyphe wie die Serumantikörper der Crf2-immunisierten Mäuse. Eine Aussage, ob das Serum der Maus 10 tatsächlich Antikörper gegen natives Crf2-Protein enthielt, ist jedoch direkt nicht möglich. Unter der Berücksichtigung der Daten aus der Western Blot- und der ELISA-Analyse ist es jedoch wahrscheinlich, dass die indirekte Färbung der Hyphen durch gebundene anti-Crf2 Serumantikörper erfolgte.

Die frühzeitige und eindeutig Differenzierung zwischen einer Candidose und einer Aspergillose ist für den Erfolg einer Therapie von großer Bedeutung. Daher wurden zur Kontrolle auf Kreuzreaktionen die Seren zusätzlich mit dem Hefepilz *Candida albicans* mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Trotz partieller Sequenzhomologie in der Aminosäuresequenz zwischen der Glykosylhydrolase CRH1 von *C. albicans* und Crf2 von *A. fumigatus* wurde keine Kreuzreaktion zwischen Seren und Sporen oder Hyphen von *C. albicans* mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Damit wäre sowohl das Crf2-Protein als diagnostischer Marker als auch die anti-Crf2 Antikörper zur Differenzierung zwischen einer Aspergillose und einer Candidose in der Immunhistochemie geeignet.

Für die weitere Charakterisierung der Glykosylhydrolase Crf2 als mögliches Vakzin und als möglicher diagnostischer Marker war die Bestimmung der immunogenen Epitope von großer Bedeutung. Mittels Peptidspottechnologie und den anti-Crf2 Immunsereen wurden die linearen immunogenen Epitope der Glykosylhydrolasen Asp f16, Crf1 und Crf2 ermittelt.

Für die Epitop-Kartierung wurden jeweils die Mausseren (Tag 0) aus der Crf2-immunisierten Gruppe 1, sowie das Serum (Tag +7) der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe, auf einer Crf2-Peptidspotmembran inkubiert. In allen Fällen konnten die Epitope SDDLDEVDWE, IEWAGGLTGYSAGPYTM, TLATSTKATP und NSSSSAEPTAAVLAF bestimmt werden. Diese schienen die hauptimmunogenen linearen Epitope des Crf2-Proteins zu sein und kamen sowohl auf dem rekombinanten als auch auf dem zellwandassoziierten Antigen vor. Neben den vier gemeinsamen Epitopen, die die Seren der Crf2-immunisierten Mäuse banden, wurden zusätzlich weitere Epitope bestimmt. Diese waren jedoch wahrscheinlich auf eine individuelle Immunantwort der Mäuse

zurückzuführen. Interessanterweise wurde das Crf2-spezifische, zusammenhängende unikale Epitop NSSSSAEPTAAVLAF sowohl von den Seren der Crf2-immunisierten Mäuse als auch vom Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe gebunden. Dieses Epitop kommt bei den Proteinen Asp f16 und Crf1 nicht zusammenhängend vor. Damit unterstützt das Vorhandensein von Serumantikörpern gegen dieses Epitop, in einer Maus, die nie in Kontakt mit rekombinantem Crf2-Protein gekommen war, dass Crf2 als Protein in *A. fumigatus* existiert.

Mit dem Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe wurden darüber hinaus die immunogenen Epitope der Antigene Crf1 und Asp f16 mittels Antikörperbindung an eine Peptidspotmembran bestimmt.

Interessanterweise wurden auf der Crf1-Peptidspotmembran lediglich die zum Crf2-Protein identischen Epitope (SDDLDEVDWE, IEWAGGLTGYSAGPYTM und TLATSTKATP) gebunden, und keine zusätzlichen im Crf1-spezifischen Aminosäureabschnitt (Position 311→404). Dieser Bereich ist scheinbar nicht immunogen oder für Serumantikörper nicht zugänglich. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass dieser Crf1-spezifische Abschnitt nach Prozessierung des Proteins nicht vorhanden ist, und dass die Crf2-Sequenz damit die einzige native prozessierte Form des Glykosylhydrolase-Gens *crf1* darstellt. Auf der Crf1-Peptidspotmembran ist das zusammenhängende Crf2-spezifische Epitop NSSSSAEPTAAVLAF in die Abschnitte NSSSSAEPT und AAVLAF getrennt. Diese Bereiche wurden jedoch durch keine Serumantikörper der Maus 10 angefärbt. Da das Serum der überlebenden Maus 10 aus der PBS-Kontrollgruppe Crf2-spezifische Antikörper, die genau an diese Sequenz banden, enthielt, war dies ein indirekter Nachweis für die Existenz des Crf2-Proteins. Die Existenz von Crf2 als Protein wurde durch zwei unabhängige Proben, sowohl auf genetischer Ebene als auch indirekt über anti-Crf2-Serumantikörper, nachgewiesen. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass das Crf2-Protein eine zufällige Variation oder Mutation darstellt.

Dieses Ergebnis bestätigte die beschriebene genetische Vielfalt von *A. fumigatus*-Isolaten und dass bei der Genomanalyse von *A. fumigatus* nicht alle bekannten Gene dem sequenzierten Stamm zugeordnet werden konnten [6,68]. Damit gibt es vermutlich bisher unbekannte, Crf2-spezifische *A. fumigatus*-Stämme und die Datenbanken müssen um die Sequenz des Crf2-Proteins erweitert werden.

Auf der Asp f16-Peptidspotmembran wurden mit dem Serum der Maus 10 erstmals die immunogenen Epitope des Asp f16-Proteins bestimmt. Es wurden jedoch lediglich die Crf1- und Crf2-spezifischen Epitope SDDLDE und TLATSTKATP erkannt und keine zusätzlichen Asp f16-spezifischen in den *frameshift*-Regionen. Entweder sind in diesen *frameshift*-Regionen keine zusätzlichen immunogenen Epitope enthalten, oder das Asp f16-Protein existiert nicht. Das Ergebnis dieser Epitop-Kartierung

bestätigte die Vermutung, dass das Protein Asp f16 nicht existiert und seine Sequenz auf einen Sequenzierfehler zurückzuführen ist [133].

Mit den Ergebnissen dieser Versuche konnte nachgewiesen werden, dass das Crf2-Protein in *A. fumigatus* exprimiert wird und vermutlich die eigentliche prozessierte *in vivo*-Proteinvariante des *crf1*-Gens ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich als Vakzin und als diagnostischer Marker eignet. Die Analyse der Serumantikörper ergab, dass das rekombinante Crf2-Protein vermutlich strukturhomolog zur nativen, zellwandassoziierten Variante ist. Demnach wäre rekombinantes Crf2-Protein zur Generierung rekombinanter Antikörper geeignet, die auch zellassoziertes Antigen binden würden.

In der Diagnostik der IA werden rekombinante Antikörper sowohl in der Immunhistochemie als auch für den Antigennachweis im Sandwich-ELISA verwendet [1]. Bislang existiert kein spezifisches Antigen, das sowohl gleichzeitig für den immunhistochemischen als auch für den serologischen Nachweis mit Antikörpern verwendet werden kann. Gegenwärtig wird für den serologischen Nachweis der IA Galactomannan als diagnostischer Marker im Sandwich-ELISA verwendet. Dieses ist jedoch nicht spezifisch für *Aspergillus*. Zudem ist es in Nahrungsmitteln, in mehreren Pilzarten und in Antibiotika enthalten und führt daher in kommerziellen Nachweissystemen, die auf Galactomannan basieren, zu falsch-positiven Ergebnissen [38,39]. Ebenso führen die derzeit verwendeten anti-Galactomannan Nachweisantikörper im Sandwich-ELISA zu falsch-positiven Resultaten. Diese Antikörper sind aus Ratten isoliert können mit dem zu untersuchenden humanen Serum kreuzreagieren. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht gegen den neuen potentiellen diagnostischen Marker Crf2 rekombinante humane bzw. humanähnliche Antikörper zu generieren. Diese sollten eine frühzeitige und eindeutige antikörperbasierte Diagnostik der IA ermöglichen und zugleich für die Therapie eingesetzt werden können.

7.3 Generierung und Charakterisierung rekombinanter anti-Crf2-Antikörper

Antikörper-Phagen-Display ist eine *in vitro*-Technologie, die es ermöglicht rekombinante Antikörper gegen unterschiedliche Antigene für die Diagnostik und Therapie zu generieren [134,98,135,136].

Für die Generierung der rekombinanten Antikörperfragmente mittels Antikörper-Phagen-Display wurde das rekombinante Crf2-Protein verwendet, da es die vollständige Aminosäuresequenz des

Asp f9-Proteins enthält.

Für die Isolation von anti-Crf2-Antikörperfragmenten wurden die humane naive Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 und eine neu generierte anti-Crf2 Immunbibliothek MAYKI verwendet. Diese Immunbibliothek wurde durch Immunisierung eines Makaken (*Macaca fascicularis*) mit rekombinantem Crf2-Protein und der Absicht erstellt, affinitätsgereifte anti-Crf2-Antikörper generieren zu können. Da Primaten mit dem Menschen nahe verwandt sind, wurde für die generierten Antikörper aus dieser Immunbibliothek eine große Sequenzähnlichkeit zu humanen Antikörper aus der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 erwartet.

Für jede Antikörpergenbibliothek wurden zwei verschiedene Selektionsmethoden angewendet. In der ersten Methode wurde das rekombinante Crf2-Protein sowohl für die Antikörperselektion als auch für das anschließende *Screening* im monoklonalen-ELISA direkt auf der Kunststoffoberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Um den potentiellen Einfluß einer partiellen Denaturierung des Antigens durch direkte Immobilisierung zu vermeiden, wurde die zweite Antikörperselektionsmethode mit dem Antigen in Lösung durchgeführt. Dafür wurden die Antikörpergenbibliotheken zuerst mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD-Protein inkubiert, und anschließend wurde das gebundene biotinylierte Antigen in einem *pull down* über magnetische Streptavidin-*beads* isoliert. Das *Screening* der isolierten Antikörperfragmente im monoklonalen-ELISA erfolgte auf biotinyliertem Crf2-BAD, das indirekt auf Streptavidin-Mikrotiterplatten immobilisiert wurde.

Aus der Antikörperselektionsmethode mit direkt immobilisiertem Antigen auf Mikrotiterplatten wurden aus beiden Antikörperbibliotheken vier bzw. fünf individuelle Antikörper isoliert. Hingegen wurden bei der Selektionsmethode in Lösung sechs individuelle anti-Crf2-Antikörperfragmente aus der Immunbibliothek MAYKI und ein Klon aus der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 isoliert.

Die Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 ist mit $5 \cdot 10^9$ individuellen Klonen erheblich komplexer als die Immunbibliothek MAYKI mit $1 \cdot 10^7$ individuellen Klonen, jedoch wurden mehr anti-Crf2 Antikörper aus der Immunbibliothek mit der Selektionsmethode in Lösung isoliert. Die Immunbibliothek MAYKI wurde durch Immunisierung mit löslichem rekombinantem Crf2-Protein erstellt und sollte trotz geringerer Diversität mehr spezifische anti-Crf2 Antikörper, die gegen lösliches rekombinantes Crf2 gerichtet sind, enthalten.

Nachdem monoklonale anti-Crf2 Antikörperfragmente isoliert wurden, sollten diese wie die anti-Crf2 Mausseren hinsichtlich ihrer Antigenbindung untersucht werden. Im Western Blot wurde überprüft welcher Einzelklon ein lineares Epitop des rekombinanten Antigens bindet. Dafür wurde in der SDS-PAGE die Antigenkonzentration so eingestellt, dass im anschließenden Western Blot mit Immunfär-

bung genau 1 µg rekombinantes Crf2-Protein je Spur mit den jeweiligen scFv-Klonen in einer *multiscreen*-Kammer inkubiert werden konnte. Interessanterweise haben aus beiden Antikörperbibliotheken die anti-Crf2-Antikörperfragmente, die auf direkt immobilisiertem Crf2-Protein isoliert wurden, lineare Epitope gebunden. Hingegen haben die anti-Crf2 Klone, die in Lösung mit *in vivo* biotinyliertem Crf2-BAD isoliert wurden, ausschließlich konformationelle Epitope gebunden. Die Antikörperselektionsmethode hatte unabhängig von der verwendeten Bibliothek demnach einen entscheidenden Einfluss auf die Bindungseigenschaft seiner isolierten Antikörper. Das Antigen wurde anscheinend durch die direkte Immobilisierung in der Konformation so beeinflusst, dass ausschließlich Binder gegen lineare Epitope isoliert werden konnten.

Nachdem die anti-Crf2 Antikörper in eine Gruppe von Bindern linearer Epitope und in eine Gruppe von Bindern konformationeller Epitope eingeteilt werden konnten, wurde in einem Crf2-*capture*-ELISA überprüft, welcher Klon zudem auch lösliches Antigen in nativer Form bindet.

Der Crf2-*capture*-ELISA diente nicht nur zur weiteren Charakterisierung der Bindungseigenschaften der isolierten Antikörperklone, sondern er sollte gleichzeitig einen diagnostischen Sandwich-ELISA nachahmen. In diesem Immunassay wurde für jeden Klon sowohl die individuelle Nachweisgrenze von nicht immobilisiertem, d. h. nicht denaturierten löslichen biotinylierten Antigen bestimmt, als auch eine mögliche Kreuzreaktion mit humanem Serum überprüft.

Interessanterweise hat aus der Antikörperselektion mit direkt immobilisiertem Crf2-Protein kein Klon der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 lösliches *in vivo* biotinyliertes Crf2-BAD gebunden, während die Klone aus der Immunbibliothek MAYKI das Antigen banden. Ein Klon aus der Immunbibliothek MAYKI kreuzreagierte vermutlich mit Bestandteilen des humanen Serums. Dieses wurde aufgrund der vermuteten Sequenzähnlichkeit zu humanen Antikörpern nicht erwartet. Für zwei monovalente scFv-Klone wurde eine Nachweisgrenze um 1 ng/mL Antigen bestimmt. Die Ausschlussgrenze für den Nachweis von Galactomannan liegt für den kommerziellen Platelia™ Sandwich-ELISA mit bivalenten Antikörpern in Europa bei 0,5 ng/mL [39]. Dieser *cut off* wäre mit bivalenten anti-Crf2 Antikörperformaten durch einen Aviditätseffekte und durch den Aufbau eines Sandwich-ELISAs sicherlich noch zu verbessern. Eine Kreuzreaktion dieser anti-Crf2 Antikörper mit humanen Serumproben wäre unwahrscheinlich, müsste mit weiteren unterschiedlichen humanen Seren dennoch überprüft werden.

Erwartungsgemäß haben alle Klone die gegen lösliches Antigen isoliert wurden, auch lösliches biotinyliertes Crf2-BAD-Protein im *capture*-ELISA gebunden. Die Nachweisgrenze für die Antikörper aus der Selektionsstrategie A1 war hingegen bedeutend geringer. Wider Erwarten, hatte ein Klon aus der naiven Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 die geringste Nachweisgrenze. Da der Makake mit

löslichem Crf2-Protein immunisiert wurde, konnten nicht nur mehr anti-Crf2 Antikörper aus der Selektion in Lösung erwartet werden, sondern auch Antikörper mit einer höheren Affinität und einer geringeren Nachweisgrenze im Crf2-*capture*-ELISA.

Der Zusammenhang zwischen der Affinität des jeweiligen Klons und der Höhe der Nachweisgrenze im Crf2-*capture*-ELISA wurde mit der Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz-Technologie (SPR) ermittelt.

Für die Affinitätsbestimmung wurde das rekombinante Crf2-Protein indirekt mittels Aminkopplung an einem CM5-Chip immobilisiert. Keiner der Klone aus der HAL 4/7 Antikörperbibliothek band das amingekoppelte Crf2-Protein auf einem CM5-Chip, wenn diese aus der Antikörperselektion mit direkt immobilisiertem Crf2-Protein isoliert wurden. Die Vermutung einer partiellen Denaturierung des rekombinanten Crf2-Proteins während der Immobilisierung an Kunststoffoberflächen wurde in der Affinitätsbestimmung bestätigt. Vermutlich wurde das Antigen bei der Aminkopplung nicht in der selben Art und Weise wie bei der Immobilisierung auf Kunststoffoberflächen denaturiert und wießt damit eine andere Konformation auf. Die partielle Denaturierung von Proteinen durch Immobilisierung an Kunststoffoberflächen ist im Zusammenhang mit der Antikörper-Phagen-Selektion bislang kaum beschrieben, konnte mit diesen Ergebnissen jedoch bestätigt werden [137,138].

Für alle Klone, die im Crf2-*capture*-ELISA das lösliche Antigen banden, konnte eine Antigenbindung mittels SPR-Technologie bestätigt und deren Affinität (K_D) bestimmt werden. Für den Klon MS130h-IIC2 konnte eine Affinität von 10^{-8} [M] ermittelt werden, die in der Größenordnung beschriebener scFvs aus komplexen naiven Antikörperbibliotheken lag [81]. Die Affinitäten der Antikörperfragmente aus der Immunbibliothek variierten zwischen 10^{-7} und 10^{-10} [M] und waren im erwarteten Bereich für isolierte scFvs aus einer Immunbibliothek (persönliche Mitteilung von Dr. M. Hust, TU Braunschweig).

Interessanterweise bestand für die einzelnen Klone kein Zusammenhang zwischen der Nachweisgrenze von löslichem Antigen im Crf2-*capture*-ELISA und der gemessenen Affinität. Die Klone MS130i-IIC3 und MS112-IIB1 besaßen eine ähnliche Affinität ($\approx 10^{-10}$ [M]) zum Crf2-Protein, jedoch lag die Nachweisgrenze im *capture*-ELISA für den Klon MS112-IIB1 um den Faktor 150 niedriger. Dieses Antikörperfragment erkennt im Gegensatz zum Klon MS130i-IIC3 ein lineares Epitop.

Da anscheinend sowohl die Affinität als auch die Art des erkannten Epitops Einfluss auf die Bindungseigenschaften eines Klons hatte, wurden die Klone für die weitere Charakterisierung in der

Immunfluoreszenzmikroskopie mit *A. fumigatus* verwendet. Dort konnte überprüft werden, welcher Klon das zellwandassoziierte native Crf2-Protein bindet und ob es Unterschiede im Färbemuster je nach Art des gebundenen Epitops gibt. Mit den polyklonalen anti-Crf2 Serumantikörpern aus der Immunisierung mit rekombinantem Antigen konnte die Differenzierung zwischen einer ruhenden und auskeimenden Spore bereits gezeigt werden. Dieses Ergebnis sollte für die monoklonalen anti-Crf2 Klone wiederholt werden, denn dadurch wäre mit diesen rekombinanten Antikörpern eine frühzeitige Diagnose, die eine Kolonisation von einer Infektion unterscheidet, möglich. Eine frühzeitige und spezifische Diagnose mit diesen Antikörpern könnte den kostenintensiven Einsatz von nebenwirkungsbefragten Antimykotika und die Letalitätsrate einer IA senken [1,139,140].

Aufgrund des Aviditätseffekts und der vereinfachten Detektion über das Fc-Fragment wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie zunächst ausgewählte scFv-Klone in das scFv-Fc-Format überführt.

Die Klone aus der Antikörperbibliothek HAL 4/7, die auf direkt immobilisiertem, d. h. partiell denaturiertem Crf2-Protein isoliert wurden, banden nicht die Hyphen. Diese Daten unterstützten sowohl die Ergebnisse aus dem Crf2-capture-ELISA als auch die aus der Affinitätsbestimmung.

Die Antikörper, die im Crf2-capture-ELISA lösliches Antigen banden, färbten hingegen in der Immunfluoreszenzmikroskopie die Hyphen und auskeimenden Sporen von *A. fumigatus* an. Trotz identischer Konzentrationen der unterschiedlichen scFv-Fc-Fusionsproteine, hatten die Klone, die lineare Epitope banden, die Zellwand am intensivsten indirekt angefärbt. Die indirekte Färbung mit den Klonen, die konformationelle Epitope banden, war hingegen bedeutend weniger intensiv. Die Färbung der Zellwand mit den monoklonalen scFv-Fc-Fusionsproteinen unterschied sich nicht nur in der Intensität, sondern auch in ihrem Muster. Während Binder gegen lineare Epitope die Zellwand gleichmäßig und durchgehend in den Wachstumsbereichen färbten, war die indirekte Färbung der Hyphen mit Bindern gegen konformationelle Epitope ungleichmäßiger und nicht homogen. Hinsichtlich des Färbereichs waren die Klone wiederum identisch. Es wurden wie mit den polyklonalen Serumantikörpern nur Bereiche aktiven Wachstums und keine ruhenden Sporen indirekt gefärbt.

Die intensivere Bindung der anti-Crf2 Antikörper, die lineare Epitope binden, kann durch die Struktur der Glykosylhydrolase Crf2 bedingt sein. Diese ist zwar wie bei Asp f9, Asp f16 oder Crf nicht exakt bekannt, aber sie gehört vermutlich zur Familie 16 und diese zeichnet sich durch ihre stark konservierte Tertiärstruktur aus. Für die endo- β -1,3-1,4-Glukanase von *Bacillus sp.* wurde diese Struktur bereits geklärt und sie besteht hauptsächlich aus aufeinanderliegenden beta-Faltblättern, in deren Peptidketten lineare Bereiche dominant sind [65,75,78,141].

Für die weitere Charakterisierung des Crf2-Proteins wurden die scFv-Fc-Fusionen in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit unterschiedlichen *Aspergillus spp.* und *C. albicans* getestet.

Bei den verwendeten Klonen war weder eine spezifische Bindung auf Hyphen noch auf Sporen der anderen Pilze zu erkennen, so dass die Glykosylhydrolase Crf2 artspezifisch für *A. fumigatus* sein muss. Zusammen mit den monoklonalen rekombinanten Antikörperfragmenten eignet sie sich somit als diagnostischer Marker in der immunhistochemischen Differentialdiagnose der durch *A. fumigatus* verursachten Aspergillose.

Für die Anwendung diagnostischer oder therapeutischer rekombinanter Antikörper sind nicht nur ihre Bindungseigenschaften, sondern auch ihre Stabilität entscheidend. Sie sollten idealerweise eine hohe Stabilität bei 37 °C besitzen, da dies den physiologischen Bedingungen entspricht, unter denen therapeutische Antikörper verwendet werden [142].

Während der Inkubation bei 37 °C in PBS oder humanem Serum wurden für die scFv-Klone unterschiedliche Stabilitäten nachgewiesen. Unabhängig von den Inkubationsbedingungen besaß der Klon MS130h-IIIC2 nach vier Wochen eine Stabilität von mehr als 60 %. Dies ist ein langer Zeitraum für die Inkubation in reinem PBS, da dort kein Schutzprotein wie in humanem Serum vorhanden war. Nur der Klon MS112-IIB1 hatte während der Inkubation in humanem Serum eine ähnlich hohe Stabilität. In der Literatur sind hinsichtlich der Stabilität von scFvs während der Lagerung bei 37 °C lediglich Halbwertszeiten zwischen wenigen Stunden bis maximal 6 Tagen beschrieben [143-145]. Effekte des Serumkomplements auf die Stabilität wurden durch die Inkubation der scFvs in hitzeinaktiviertem und in nicht hitzeinaktiviertem Serum ausgeschlossen.

Für therapeutische Anwendungen von rekombinanten Antikörpern im Menschen ist neben deren Bindungseigenschaften und Stabilität auch deren potentielle Immunogenität von großer Bedeutung. Die Immunogenität von Antikörpern gilt als geringer, je höher die „humane Identität“ des rekombinanten Antikörpers ist [119]. Ein eindeutiger Nachweis für die Immunogenität kann erst *in vivo* in klinischen Phasen erfolgen, jedoch kann durch Sequenzvergleiche mit Datenbanken die Ähnlichkeit zu humanen Antikörper-Keimbahnsequenzen vorhergesagt werden.

Der Grad der „humanen Identität“ der isolierten anti-Crf2 Antikörpergensequenzen wurde mittels der Humanness-Analyse und dem *germinality*-Index *in silico* bestimmt. Per Definition gilt ein Antikörper aus einer humanen Antikörperbibliothek jedoch *per se* als human [119].

Für die Herstellung der Immunbibliothek MAYKI wurde ein Makake mit rekombinantem Crf2-Protein immunisiert, da dieser relativ nahe mit dem Menschen verwandt ist und dessen Antikörpergensequenzen somit eine hohe humane Identität besitzen sollten. Für therapeutische

Anwendungen wäre daher der nachträgliche Humanisierungsaufwand geringer als bei Mausantikörpern.

Die Klone aus der humanen Antikörperbibliothek HAL 4/7 hatten erwartungsgemäß einen höheren *germinality*-Index als die Klone aus der Immunbibliothek MAYKI, der größtenteils bei etwa 90 % lag. In der zweiten Methode, der Bestimmung der *Humanness*, gab es zwei Abweichungen, die die Schwierigkeit der *in silico* Vorhersage von humanen Identitäten bestätigten. Die humanen Klone DoH12.2-III A11 und DoH12.2-IIID11 besaßen einen *Z-score*, der im Grenzbereich der *Humanness*-Skala lag. Die Bestimmung der Humanität beruht auf Sequenzvergleichen von Antikörpern inklusive der variablen Region (CDR), die wiederum für jede Antikörpergensequenz individuell ist. Nach dieser Berechnung wäre, im Vergleich zum *germinality*-Index, entweder die CDR-Sequenz „immunogen“ oder die verwendete Datenbank ist nicht ausreichend komplex, um die individuellen CDR-Sequenzen zu berücksichtigen.

Für therapeutische, humane Antikörper wurden schon ähnliche Abweichungen im *Z-score* beschrieben, die mit den *in vivo* Daten nicht übereinstimmten. Der voll-humane Antikörper „Humira“ besitzt gemäß der *Humanness*-Analyse einen niedrigeren *Z-score* als der humanisierte Antikörper „Campath-1H“ oder der chimäre Antikörper „U36“ [119]. Von den generierten anti-Crf2 Antikörpern, die sich in ihren Bindungseigenschaften und ihrer Stabilität auszeichneten, besaßen alle Antikörper bis auf Klon MS112-IIB1 sowohl im *germinality*-Index als auch in der *Humanness*-Analyse einen hohen Grad humaner Identität. Im Falle einer therapeutische Anwendungen könnte die schwere Kette des Klons MS112-IIB1 nachträglich weiter „humanisiert“ werden [118].

Die Ergebnisse aus der Charakterisierung der rekombinanten Antikörperfragmente bestätigten die Vermutung, dass potentiell diagnostische oder therapeutische Antikörper mit rekombinantem Crf2-Protein isoliert werden könnten. Es wurde zudem gezeigt, dass die Wahl der Antikörperselektionsmethode bei Verwendung einer naiven Antikörperbibliothek einen entscheidenden Einfluss auf die Art der isolierten Binder hat. Es konnten anti-Crf2 Antikörper isoliert und charakterisiert werden, die von ihren Eigenschaften sowohl für die antikörperbasierte Diagnostik einer IA, als auch für eine passive Immunisierung fungieren können.

8 Ausblick

Die Glykosyhydrolasen-Variante Crf2 von *A. fumigatus* ist artspezifisch und wirkte in ersten aktiven Immunisierungsversuchen protektiv gegen eine Invasive Aspergillose (IA). Somit ist das Crf2-Protein sowohl für den Einsatz als diagnostischer Marker als auch für die Therapie der IA geeignet. Die isolierten rekombinanten anti-Crf2 Antikörper eignen sich aufgrund ihrer hohen Stabilität und Affinität zum rekombinanten und zum zellwandassoziierten Crf2-Protein ebenso für die Diagnostik.

Um das Crf2-Protein als diagnostischen Marker zu evaluieren, müssen zusammen mit den isolierten rekombinanten Crf2 Antikörpern umfangreiche serologische Studien durchgeführt werden. Der serologische Nachweis wird mit den charakterisierten rekombinanten anti-Crf2 Antikörpern und humanen Serumproben in einem Sandwich-ELISA durchgeführt.

Für die zukünftige Anwendung des Crf2-Proteins als Vakzin muss in einer umfangreicheren Immunisierungsstudie der Mechanismus der vermittelten Protektion bestimmt werden. Hierzu muss aus dem Serum Crf2-immunisierter Tiere sowohl ein getrennter T-Zelltransfer als auch ein getrennter anti-Crf2 Antikörpertransfer in andere Mausgruppen mit anschließender Infektion mit Sporen von *A. fumigatus* erfolgen. Dadurch kann ermittelt werden, ob es sich bei der Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein um eine protektive T-Zellantwort und/oder um eine protektive B-Zellantwort handelt.

Handelt es sich bei der Protektion um eine B-Zell Immunität, können die isolierten rekombinanten anti-Crf2 Antikörper in ein scFv-Fc-Format konvertiert werden und für eine passive Immunisierung verwendet werden.

Die anti-Crf2 Antikörper werden für den immunhistochemischen Nachweis von *A. fumigatus* in Gewebepräparaten und zur Differenzierung zwischen anderen humanpathogenen Pilzen eingesetzt, wodurch das Crf2-Protein gleichzeitig als diagnostischer Marker weiter evaluiert wird.

Als weitere Möglichkeit zur Bestimmung einer IA wird eine PCR-basierten Diagnostik aufgebaut, die die DNA von Crf2 in Patientenseren nachweist.

9 Quellenverzeichnis

- [1] W.W. Hope, T.J. Walsh, und D.W. Denning, "Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 5, Okt. 2005, S. 609-22.
- [2] "The Genus *Aspergillus*. Kenneth B. Raper and Dorothy I. Fennell. With a chapter by Peter K. C. Austwick. Williams and Wilkins, Baltimore, 1965. xii + 686 pp. Illus. \$20," Mai. 1965.
- [3] "Aspergillus Species."
- [4] "The Aspergillus/Aspergillosis Website."
- [5] T.J. O'Dea, "Protecting the immunocompromised patient: the role of the hospital clinical engineer," *Journal of Clinical Engineering*, vol. 21, S. 466-82.
- [6] V. Chazalet, J. Debeaupuis, J. Sarfati, J. Lortholary, P. Ribaud, P. Shah, M. Cornet, H.V. Thien, E. Gluckman, G. Brucker, und J. Latge, "Molecular Typing of Environmental and Patient Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Various Hospital Settings," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, Juni. 1998, S. 1494-1500.
- [7] J. Latge, "Aspergillus fumigatus and Aspergillosis," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, Apr. 1999, S. 310-350.
- [8] "DocCheck."
- [9] D.W. Denning, "Invasive aspergillosis," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 26, Apr. 1998, S. 781-803; quiz 804-5.
- [10] R. Amitani, T. Murayama, R. Nawada, W. Lee, A. Niimi, K. Suzuki, E. Tanaka, und F. Kuze, "Aspergillus culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro," *Eur Respir J*, vol. 8, Okt. 1995, S. 1681-1687.
- [11] B.W. Robinson, T.J. Venaille, A.H. Mendis, und R. McAleer, "Allergens as proteases: an *Aspergillus fumigatus* proteinase directly induces human epithelial cell detachment," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 86, Nov. 1990, S. 726-31.
- [12] T.M. Hohl und M. Feldmesser, "Aspergillus fumigatus: PRINCIPLES OF PATHOGENESIS AND HOST DEFENSE," *Eukaryotic Cell*, Sep. 2007, S. EC.00274-07.
- [13] Y. Kamai, A.S. Lossinsky, H. Liu, D.C. Sheppard, und S.G. Filler, "Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*," *Cellular Microbiology*, vol. 11, Jan. 2009, S. 170-82.
- [14] J.E. Basich, T.S. Graves, M.N. Baz, G. Scanlon, R.G. Hoffmann, R. Patterson, und J.N. Fink, "Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 68, Aug. 1981, S. 98-102.

- [15] A. Knutsen und R.G. Slavin, "Allergic bronchopulmonary mycosis complicating cystic fibrosis," *Seminars in Respiratory Infections*, vol. 7, Sep. 1992, S. 179-92.
- [16] R. Agarwal, "Allergic bronchopulmonary aspergillosis," *Chest*, vol. 135, März. 2009, S. 805-26.
- [17] D.A. Stevens, V.L. Kan, M.A. Judson, V.A. Morrison, S. Dummer, D.W. Denning, J.E. Bennett, T.J. Walsh, T.F. Patterson, und G.A. Pankey, "Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 30, Apr. 2000, S. 696-709.
- [18] S. Kawamura, S. Maesaki, K. Tomono, T. Tashiro, und S. Kohno, "Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma," *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, vol. 39, März. 2000, S. 209-12.
- [19] C. Viscoli, M. Machetti, P. Gazzola, A. De Maria, D. Paola, M.T. Van Lint, F. Gualandi, M. Truini, und A. Bacigalupo, "*Aspergillus galactomannan* antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, Apr. 2002, S. 1496-9.
- [20] T.F. Patterson, W.R. Kirkpatrick, M. White, J.W. Hiemenz, J.R. Wingard, B. Dupont, M.G. Rinaldi, D.A. Stevens, und J.R. Graybill, "Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 *Aspergillus* Study Group," *Medicine*, vol. 79, Juli. 2000, S. 250-60.
- [21] D.O. Garrett, E. Jochimsen, und W. Jarvis, "Invasive *Aspergillus* spp infections in rheumatology patients," *The Journal of Rheumatology*, vol. 26, Jan. 1999, S. 146-9.
- [22] A.H. Groll, P.M. Shah, C. Mentzel, M. Schneider, G. Just-Nuebling, und K. Huebner, "Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital," *The Journal of Infection*, vol. 33, Juli. 1996, S. 23-32.
- [23] M. Vogeser, A. Wanders, A. Haas, und G. Ruckdeschel, "A four-year review of fatal *Aspergillosis*," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, vol. 18, Jan. 1999, S. 42-5.
- [24] Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, "Diagnosedaten der Krankenhäuser nach Behandlungsort (ICD10-4-Steller, ab 2000)."
- [25] M. Knoke, H. Bernhardt, und G. Schwesinger, "Is there a need for autopsies in the management of fungal disease?," *Mycoses*, vol. 51, Juli. 2008, S. 291-300.
- [26] D.W. Denning, "Diagnosis and management of invasive aspergillosis," *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, vol. 16, 1996, S. 277-99.
- [27] J. Aisner, P.H. Wiernik, und S.C. Schimpff, "Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment to response," *Annals of Internal Medicine*, vol. 86, Mai. 1977, S. 539-43.

- [28] J. Chander, A. Chakrabarti, A. Sharma, J.S. Saini, und D. Panigarhi, "Evaluation of Calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer," *Mycoses*, vol. 36, S. 243-5.
- [29] J.K. Choi, J. Mauger, und K.L. McGowan, "Immunohistochemical detection of *Aspergillus* species in pediatric tissue samples," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 121, Jan. 2004, S. 18-25.
- [30] R. Rüchel und M. Schaffrinski, "Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, Aug. 1999, S. 2694-6.
- [31] M. von Eiff, N. Roos, R. Schulten, M. Hesse, M. Zühlsdorf, und J. van de Loo, "Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival," *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, vol. 62, 1995, S. 341-7.
- [32] G. Krennmair, F. Lenglinger, und H. Müller-Schelken, "Computed tomography (CT) in the diagnosis of sinus aspergillosis," *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, vol. 22, Apr. 1994, S. 120-5.
- [33] S.F. Yeo und B. Wong, "Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, Juli. 2002, S. 465-84.
- [34] Z. Odabasi, G. Mattiuzzi, E. Estey, H. Kantarjian, F. Saeki, R.J. Ridge, P.A. Ketchum, M.A. Finkelman, J.H. Rex, und L. Ostrosky-Zeichner, "Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 39, Juli. 2004, S. 199-205.
- [35] C. Pazos, M. Moragues, G. Quindós, J. Pontón, und A. del Palacio, "Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients," *Revista Iberoamericana De Micología: Órgano De La Asociación Española De Especialistas En Micología*, vol. 23, Dez. 2006, S. 209-15.
- [36] J.W. Pickering, H.W. Sant, C.A.P. Bowles, W.L. Roberts, und G.L. Woods, "Evaluation of a (1→3)-β-d-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, Dez. 2005, S. 5957–5962.
- [37] T. Miyazaki, S. Kohno, K. Mitsutake, S. Maesaki, K. Tanaka, N. Ishikawa, und K. Hara, "Plasma (1→3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, Dez. 1995, S. 3115-8.
- [38] L.J. Wheat und T.J. Walsh, "Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*,

- vol. 27, Apr. 2008, S. 245-51.
- [39] L. Wheat, "Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection," *Transplant Infectious Disease*, vol. 5, 2003, S. 158-166.
 - [40] C.M. Swanink, J.F. Meis, A.J. Rijs, J.P. Donnelly, und P.E. Verweij, "Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, Jan. 1997, S. 257-60.
 - [41] A. Upton, A. Gugel, W. Leisenring, A. Limaye, B. Alexander, R. Hayden, und K.A. Marr, "Reproducibility of low galactomannan enzyme immunoassay index values tested in multiple laboratories," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, Sep. 2005, S. 4796-800.
 - [42] M.A.S.H. Mennink-Kersten, D. Ruegebrink, R.R. Klont, A. Warris, F. Gavini, H.J.M. Op den Camp, und P.E. Verweij, "Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, Aug. 2005, S. 3925-31.
 - [43] R. Ansorg, R. van den Boom, und P.M. Rath, "Detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in foods and antibiotics," *Mycoses*, vol. 40, Dez. 1997, S. 353-7.
 - [44] N. Singh, A. Obman, S. Husain, S. Aspinall, S. Mietzner, und J.E. Stout, "Reactivity of platelia *Aspergillus galactomannan* antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentrations in serum," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, Juni. 2004, S. 1989-92.
 - [45] S.F. Yeo und B. Wong, "Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, Juli. 2002, S. 465-484.
 - [46] D. Buchheidt und M. Hummel, "Aspergillus polymerase chain reaction (PCR) diagnosis," *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, vol. 43 Suppl 1, Mai. 2005, S. S139-45.
 - [47] A. Francesconi, M. Kasai, S.M. Harrington, M.G. Beveridge, R. Petraitiene, V. Petraitis, R.L. Schaufele, und T.J. Walsh, "Automated and manual methods of DNA extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* analyzed by quantitative real-time PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, Juni. 2008, S. 1978-84.
 - [48] S. Kawamura, S. Maesaki, T. Noda, Y. Hirakata, K. Tomono, T. Tashiro, und S. Kohno, "Comparison between PCR and Detection of Antigen in Sera for Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, Jan. 1999, S. 218-220.
 - [49] A.J.H.A. Ament, M.W.A. Hübber, P.E. Verweij, R. de Groot, A. Warris, J.P. Donnelly, J. van 't Wout, und J.L. Severens, "Economic evaluation of targeted treatments of invasive aspergillosis in adult haematopoietic stem cell transplant recipients in the Netherlands: a modelling approach," *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, Aug. 2007, S. 385-93.

- [50] L. Slobbe, S. Polinder, J.K. Doorduijn, P.J. Lugtenburg, A. el Barzouhi, E.W. Steyerberg, und B.J.A. Rijnders, "Outcome and medical costs of patients with invasive aspergillosis and acute myelogenous leukemia-myelodysplastic syndrome treated with intensive chemotherapy: an observational study," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 47, Dez. 2008, S. 1507-12.
- [51] J.R. Wingard, R. Herbrecht, J. Mauskopf, H.T. Schlamm, A. Marciniak, und C.S. Roberts, "Resource use and cost of treatment with voriconazole or conventional amphotericin B for invasive aspergillosis," *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, vol. 9, Sep. 2007, S. 182-8.
- [52] L.S. Wilson, C.M. Reyes, M. Stolpman, J. Speckman, K. Allen, und J. Beney, "The direct cost and incidence of systemic fungal infections," *Value in Health: The Journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research*, vol. 5, S. 26-34.
- [53] K.B. Tong, C.J. Lau, K. Murtagh, A.J. Layton, und R. Seifeldin, "The economic impact of aspergillosis: analysis of hospital expenditures across patient subgroups," *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, vol. 13, Jan. 2009, S. 24-36.
- [54] Kontoyiannis, D. Kontoyiannis, Bodey, und G. Bodey, "Invasive Aspergillosis in 2002: An Update," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 21, März. 2002, S. 161-172.
- [55] D.P. Kontoyiannis, D. Sumoza, J. Tarrand, G.P. Bodey, R. Storey, und I.I. Raad, "Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 31, Juli. 2000, S. 188-9.
- [56] R.Y. Hachem, D.P. Kontoyiannis, M.R. Boktour, C. Afif, C. Cooksley, G.P. Bodey, I. Chatzinikolaou, C. Perego, H.M. Kantarjian, und I.I. Raad, "Aspergillus terreus: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies," *Cancer*, vol. 101, Okt. 2004, S. 1594-600.
- [57] G.[. Maschmeyer und M.[. Ruhnke, "Update on antifungal treatment of invasive Candida and Aspergillus infections," *Mycoses*, vol. 47, Aug. 2004, S. 263-276.
- [58] B.[. Banerjee, V.P.[. Kurup, P.A.[. Greenberger, B.D.[. Johnson, und J.N.[. Fink, "Cloning and expression of Aspergillus fumigatus allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA)," *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 31, Mai. 2001, S. 761-770.
- [59] N. Denikus, F. Orfaniotou, G. Wulf, P.F. Lehmann, M. Monod, und U. Reichard, "Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis," *Infection and Immunity*, vol. 73, Aug. 2005, S. 4704-13.

- [60] S. Bozza, R. Gaziano, G.B. Lipford, C. Montagnoli, A. Bacci, P. Di Francesco, V.P. Kurup, H. Wagner, und L. Romani, "Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants," *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, vol. 4, Nov. 2002, S. 1281-90.
- [61] N. Delgado, J. Xue, J. Yu, C. Hung, und G.T. Cole, "A recombinant beta-1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis," *Infection and Immunity*, vol. 71, Juni. 2003, S. 3010-9.
- [62] J.I. Ito, J.M. Lyons, T.B. Hong, D. Tamae, Y. Liu, S.P. Wilczynski, und M. Kalkum, "Vaccinations with Recombinant Variants of *Aspergillus fumigatus* Allergen Asp f 3 Protect Mice against Invasive Aspergillosis," *Infection and Immunity*, vol. 74, Sep. 2006, S. 5075–5084.
- [63] J. Ito, J. Lyons, D. Diaz-Arevalo, T. Hong, und M. Kalkum, "Vaccine progress," *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, Feb. 2009, S. 1-7.
- [64] A. Torosantucci, C. Bromuro, P. Chiani, F.D. Bernardis, F. Berti, C. Galli, F. Norelli, C. Bellucci, L. Polonelli, P. Costantino, R. Rappuoli, und A. Cassone, "A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, Sep. 2005, S. 597–606.
- [65] B. Henrissat, I. Callebaut, S. Fabrega, P. Lehn, J.P. Mornon, und G. Davies, "Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, Juli. 1995, S. 7090-4.
- [66] G. Davies und B. Henrissat, "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases," *Structure (London, England: 1993)*, vol. 3, Sep. 1995, S. 853-9.
- [67] sanger institue, "Pfam: Home page."
- [68] W.C. Nierman, A. Pain, und D.W. Denning, "Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*," *Nature*, vol. 438, Dez. 2005, S. 1151-6.
- [69] T. Fontaine, T. Magnin, A. Melhert, D. Lamont, J. Latge, und M.A.J. Ferguson, "Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins," *Glycobiology*, Okt. 2002, S. Cwg004.
- [71] A. Beauvais und J. Latge, "Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*," *Drug Resistance Updates*, vol. 4, Feb. 2001, S. 38-49.
- [71] M. Momany und I. Taylor, "Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 146 Pt 12, Dez. 2000, S. 3279-84.

- [72] M. Momany, R. Lindsey, T.W. Hill, E.A. Richardson, C. Momany, M. Pedreira, G.M. Guest, J.F. Fisher, R.B. Hessler, und K.A. Roberts, "The *Aspergillus fumigatus* cell wall is organized in domains that are remodelled during polarity establishment," *Microbiology*, vol. 150, Okt. 2004, S. 3261-3268.
- [73] J. Arroyo, J. Sarfati, M.T. Baixench, E. Ragni, M. Guillen, J.M. Rodriguez-Pena, L. Popolo, und J.P. Latge, "The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens," *Yeast*, vol. 24, 2007, S. 289-296.
- [74] H. Li, H. Zhou, Y. Luo, H. Ouyang, H. Hu, und C. Jin, "Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence," *Molecular Microbiology*, vol. 64, 2007, S. 1014-1027.
- [75] T. Keitel, O. Simon, R. Borriss, und U. Heinemann, "Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, Juni. 1993, S. 5287-91.
- [76] "Probable glycosidase crf1 precursor - *Aspergillus fumigatus*."
- [77] Janeway, "Immunobiology 6th edition."
- [78] A. D R Davies und H Metzger, "Structural Basis of Antibody Function," Nov. 2003.
- [79] Abul K.Abbas et al., "Cellular and Molecular Immunology, 6th Edition - Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, & Shiv Pillai. ISBN:9781416031222."
- [80] G.M. EDELMAN, "Antibody Structure and Molecular Immunology," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 34, 1991, S. 4-22.
- [81] A.D. Griffiths, M. Malmqvist, J.D. Marks, J.M. Bye, M.J. Embleton, J. McCafferty, M. Baier, K.P. Holliger, B.D. Gorick, und N.C. Hughes-Jones, "Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries," *The EMBO Journal*, vol. 12, Feb. 1993, S. 725-34.
- [82] T.T. Wu und E.A. Kabat, "AN ANALYSIS OF THE SEQUENCES OF THE VARIABLE REGIONS OF BENCE JONES PROTEINS AND MYELOMA LIGHT CHAINS AND THEIR IMPLICATIONS FOR ANTIBODY COMPLEMENTARITY," *J. Exp. Med.*, vol. 132, Aug. 1970, S. 211-250.
- [83] E. Liddell, *Antikörper-Techniken*, Heidelberg ;;Berlin ;;Oxford: Spektrum Akad. Verl., 1996.
- [84] R.R. PORTER, "Structural Studies of Immunoglobulins," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 34, 1991, S. 382-388.
- [85] R.A. Beckman, L.M. Weiner, und H.M. Davis, "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors," *Cancer*, vol. 109, Jan. 2007, S. 170-9.

- [86] R.E. Bird, K.D. Hardman, J.W. Jacobson, S. Johnson, B.M. Kaufman, S.M. Lee, T. Lee, S.H. Pope, G.S. Riordan, und M. Whitlow, "Single-chain antigen-binding proteins," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 242, Okt. 1988, S. 423-6.
- [87] J.S. Huston, D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.S. Tai, J. Novotný, M.N. Margolies, R.J. Ridge, R.E. Brucoleri, E. Haber, und R. Crea, "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, Aug. 1988, S. 5879–5883.
- [88] A. Schmiedl, F. Breitling, C.H. Winter, I. Queitsch, und S. Dübel, "Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*," *Journal of Immunological Methods*, vol. 242, Aug. 2000, S. 101-14.
- [89] A. Wörn und A. Plückthun, "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments," *Journal of Molecular Biology*, vol. 305, Feb. 2001, S. 989-1010.
- [90] A. Skerra und A. Plückthun, "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 240, Mai. 1988, S. 1038-41.
- [91] T. Schirrmann, L. Al-Halabi, S. Dübel, und M. Hust, "Production systems for recombinant antibodies," *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, vol. 13, 2008, S. 4576-94.
- [92] G.P. Smith, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 228, Juni. 1985, S. 1315-7.
- [93] Webster et al., "Phage Display: A Laboratory Manual - Google Buchsuche," 2001.
- [94] F. Breitling, S. Dübel, T. Seehaus, I. Klewinghaus, und M. Little, "A surface expression vector for antibody screening," *Gene*, vol. 104, Aug. 1991, S. 147-53.
- [95] J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter, und D.J. Chiswell, "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains," *Nature*, vol. 348, Dez. 1990, S. 552-4.
- [96] C.F.B. 3rd, A.S. Kang, R.A. Lerner, und S.J. Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, Sep. 1991, S. 7978–7982.
- [97] H.R. Hoogenboom, A.D. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, P. Hudson, und G. Winter, "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains," *Nucleic Acids Research*, vol. 19, Aug. 1991, S. 4133–4137.
- [98] M. Hust und S. Dübel, "Mating antibody phage display with proteomics," *Trends in Biotechnology*, vol. 22, Jan. 2004, S. 8-14.

- [99] J.D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, und G. Winter, "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage," *Journal of Molecular Biology*, vol. 222, Dez. 1991, S. 581-97.
- [100] A.D. Griffiths, S.C. Williams, O. Hartley, I.M. Tomlinson, P. Waterhouse, W.L. Crosby, R.E. Kontermann, P.T. Jones, N.M. Low, und T.J. Allison, "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires," *The EMBO Journal*, vol. 13, Juli. 1994, S. 3245-60.
- [101] H. Thie, B. Voedisch, S. Dübel, M. Hust, und T. Schirrmann, "Affinity maturation by phage display," *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 525, 2009, S. 1-14.
- [102] L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G.N. Wellnhofer, A. Hoess, J.W. Lle, A.P. Ckthun, und B. Virnekaës, "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides," *J. MOL. BIOL.*, vol. 296, 2000, S. 57—86.
- [103] N. Hayashi, M. Welschhof, M. Zewe, M. Braunagel, S. Dübel, F. Breitling, und M. Little, "Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR," *BioTechniques*, vol. 17, Aug. 1994, S. 310, 312, 314-5.
- [104] H.J. de Haard, N. van Neer, A. Reurs, S.E. Hufton, R.C. Roovers, P. Henderikx, A.P. de Bruïne, J.W. Arends, und H.R. Hoogenboom, "A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, Juni. 1999, S. 18218-30.
- [105] S.F. Parmley und G.P. Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, vol. 73, Dez. 1988, S. 305-18.
- [106] M. Hust, E. Maiss, H. Jacobsen, und T. Reinard, "The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease," *Journal of Virological Methods*, vol. 106, Dez. 2002, S. 225-33.
- [107] R.E. Hawkins, S.J. Russell, und G. Winter, "Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation," *Journal of Molecular Biology*, vol. 226, Aug. 1992, S. 889-96.
- [108] J. Vieira und J. Messing, "Production of single-stranded plasmid DNA," *Methods in Enzymology*, vol. 153, 1987, S. 3-11.
- [109] S. Rondot, J. Koch, F. Breitling, und S. Dübel, "A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display," *Nature Biotechnology*, vol. 19, Jan. 2001, S. 75-8.
- [110] G. Ramadan, B. Davies, V.P. Kurup, und C.A. Keever-Taylor, "Generation of cytotoxic T cell responses directed to human leucocyte antigen Class I restricted epitopes from the *Aspergillus* fl6 allergen," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 140, Apr. 2005, S. 81–91.

- [111] J.M. Bruneau, T. Magnin, E. Tagat, R. Legrand, M. Bernard, M. Diaquin, C. Fudali, und J.P. Latgé, "Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis," *Electrophoresis*, vol. 22, Aug. 2001, S. 2812-23.
- [112] A. Beauvais, J.M. Bruneau, P.C. Mol, M.J. Buitrago, R. Legrand, und J.P. Latgé, "Glucan Synthase Complex of *Aspergillus fumigatus*," *Journal of Bacteriology*, vol. 183, Apr. 2001, S. 2273–2279.
- [113] J.M. Daley, A.A. Thomay, M.D. Connolly, J.S. Reichner, und J.E. Albina, "Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice," *J Leukoc Biol*, vol. 83, Jan. 2008, S. 64-70.
- [114] F. Staib, S.K. Mishra, C. Rajendran, R. Voigt, J. Steffen, K.H. Neumann, C.A. Hartmann, und G. Heins, "A notable *Aspergillus* from a mortal aspergilloma of the lung. New aspects of the epidemiology, serodiagnosis and taxonomy of *Aspergillus fumigatus*," *Zentralblatt Für Bakteriologie. 1. Abt. Originale. A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten Und Parasitologie*, vol. 247, 1980, S. 530-6.
- [115] M. Hust, T. Jostock, C. Menzel, B. Voedisch, A. Mohr, M. Brenneis, M.I. Kirsch, D. Meier, und S. Dübel, "Single chain Fab (scFab) fragment," *BMC Biotechnology*, vol. 7, 2007, S. 14.
- [116] I. Retter, H.H. Althaus, R. Munch, und W. Muller, "VBASE2, an integrative V gene database," *Nucl. Acids Res.*, vol. 33, Jan. 2005, S. D671-674.
- [117] S. Mollova, I. Retter, und W. Muller, "Visualising the immune repertoire," *BMC Systems Biology*, vol. 1, 2007, S. P30.
- [118] T. Pelat, H. Bedouelle, A.R. Rees, S.J. Crennell, M. Lefranc, und P. Thullier, "Germline Humanization of a Non-human Primate Antibody that Neutralizes the Anthrax Toxin, by in Vitro and in Silico Engineering," *Journal of Molecular Biology*, vol. 384, Dez. 2008, S. 1400-1407.
- [119] K.R. Abhinandan und A.C.R. Martin, "Analyzing the "degree of humanness" of antibody sequences," *Journal of Molecular Biology*, vol. 369, Juni. 2007, S. 852-62.
- [120] K.B. Tong, C.J. Lau, K. Murtagh, A.J. Layton, und R. Seifeldin, "The economic impact of aspergillosis: analysis of hospital expenditures across patient subgroups," *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, vol. 13, Jan. 2009, S. 24-36.
- [121] K. Wang, D.W. Ussery, und S. Brunak, "Analysis and prediction of gene splice sites in four *Aspergillus* genomes," *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, Okt. 2008.
- [122] K.H. Kim, J.H. Shim, M.C. Cho, J.W. Kang, H.E. Yoon, D.Y. Yoon, J.W. Kim, D.J. Son, J.W. Lee, E.S. Jeong, J.T. Hong, und D.C. Moon, "[Development of enzyme linked immunosorbent assay for erythropoietin.]," *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, vol. 26, Juni. 2006, S. 185-91.

- [123] W. Hoesel, J. Gross, R. Moller, B. Kanne, A. Wessner, G. Müller, A. Müller, E. Gromnica-Ihle, M. Fromme, S. Bischoff, und A. Haselbeck, "Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera," *Journal of Immunological Methods*, vol. 294, Nov. 2004, S. 101-10.
- [124] R. Kappe und D. Rimek, "Antikörper-Nachweis bei invasiver Aspergillose," *Mycoses*, vol. 47, 2004, S. 55-59.
- [125] A. Rivera, H.L.V. Epps, T.M. Hohl, G. Rizzuto, und E.G. Pamer, "Distinct CD4+-T-Cell Responses to Live and Heat-Inactivated *Aspergillus fumigatus* Conidia," *Infection and Immunity*, vol. 73, Nov. 2005, S. 7170-7179.
- [126] B.E. Morrison, S.J. Park, J.M. Mooney, und B. Mehrad, "Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, Dez. 2003, S. 1862-1870.
- [127] N.P. Wiederhold, R.E. Lewis, und D.P. Kontoyiannis, "Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies," *Pharmacotherapy*, vol. 23, Dez. 2003, S. 1592-610.
- [128] H. Hebart, C. Bollinger, P. Fisch, J. Sarfati, C. Meisner, M. Baur, J. Loeffler, M. Monod, J. Latgé, und H. Einsele, "Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies," *Blood*, vol. 100, Dez. 2002, S. 4521-8.
- [129] E. Cenci, A. Mencacci, C. Fè d'Ostiani, G. Del Sero, P. Mosci, C. Montagnoli, A. Bacci, und L. Romani, "Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 178, Dez. 1998, S. 1750-60.
- [130] E. Cenci, A. Mencacci, G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, C.F. d'Ostiani, P. Mosci, M. Bachmann, F. Bistoni, M. Kopf, und L. Romani, "Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, Dez. 1999, S. 1957-68.
- [131] I. Mouyna, W. Morelle, M. Vai, M. Monod, B. L  chenne, T. Fontaine, A. Beauvais, J. Sarfati, M. Pr  vost, C. Henry, und J. Lat  g  , "Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*," *Molecular Microbiology*, vol. 56, Juni. 2005, S. 1675-88.
- [132] T. Fontaine, T.K. Smith, A. Crossman, J.S. Brimacombe, J. Lat  g  , und M.A.J. Ferguson, "In vitro biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol in *Aspergillus fumigatus*," *Biochemistry*, vol. 43, Dez. 2004, S. 15267-75.
- [133] P. Bowyer und D.W. Denning, "Genomic analysis of allergen genes in *Aspergillus* spp: the relevance of genomics to everyday research," *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, vol. 45, Feb. 2007, S. 17-26.
- [134] G. Winter und C. Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, vol. 349, Jan. 1991, S. 293-9.

- [135] H. Thie, T. Meyer, T. Schirrmann, M. Hust, und S. Dübel, "Phage display derived therapeutic antibodies," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 9, Dez. 2008, S. 439-46.
- [136] H.R. Hoogenboom, "Selecting and screening recombinant antibody libraries," *Nature Biotechnology*, vol. 23, Sep. 2005, S. 1105-16.
- [137] R. Lundquist, L.K. Nielsen, A. Jafarshad, D. SoeSoe, L.H. Christensen, P. Druilhe, und M.H. Dziegiel, "Human Recombinant Antibodies against Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 3 Cloned from Peripheral Blood Leukocytes of Individuals with Immunity to Malaria Demonstrate Antiparasitic Properties," *Infect. Immun.*, vol. 74, Juni. 2006, S. 3222-3231.
- [138] J. Gross, R. Moller, W. Henke, und W. Hoesel, "Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO," *Journal of Immunological Methods*, vol. 313, Juni. 2006, S. 176-182.
- [139] L. Slobbe, S. Polinder, J.K. Doorduyn, P.J. Lugtenburg, A. el Barzouhi, E.W. Steyerberg, und B.J.A. Rijnders, "Outcome and medical costs of patients with invasive aspergillosis and acute myelogenous leukemia-myelodysplastic syndrome treated with intensive chemotherapy: an observational study," *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 47, Dez. 2008, S. 1507-12.
- [140] K.B. Tong, C.J. Lau, K. Murtagh, A.J. Layton, und R. Seifeldin, "The economic impact of aspergillosis: analysis of hospital expenditures across patient subgroups," *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, vol. 13, Jan. 2009, S. 24-36.
- [141] B. Henrissat und G. Davies, "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 7, Okt. 1997, S. 637-44.
- [142] J. Willuda, A. Honegger, R. Waibel, P.A. Schubiger, R. Stahel, U. Zangemeister-Wittke, und A. Pluckthun, "High Thermal Stability Is Essential for Tumor Targeting of Antibody Fragments: Engineering of a Humanized Anti-epithelial Glycoprotein-2 (Epithelial Cell Adhesion Molecule) Single-Chain Fv Fragment," *Cancer Res*, vol. 59, Nov. 1999, S. 5758-5767.
- [143] M. Dona, C. Giorgi, und L. Accardi, "Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the Human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis," *BMC Cancer*, vol. 7, 2007, S. 25.
- [144] P.S. Chowdhury, J.L. Viner, R. Beers, und I. Pastan, "Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumoractivity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, Jan. 1998, S. 669-674.
- [145] J. Krauss, M.A.E. Arndt, A.C.R. Martin, H. Liu, und S.M. Rybak, "Specificity grafting of human antibody frameworks selected from a phage display library: generation of a highly stable humanized anti-CD22 single-chain Fv fragment," *Protein Engineering*, vol. 16, Okt. 2003, S. 753-9.

- [146] Cloutier SM, Couty S, Terskikh A, Marguerat L, Crivelli V, et al. (2000) Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol Immunol* 37: 1067–77.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2006 bis April 2009 in der Abteilung Biotechnologie des Instituts für Biochemie und Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Promotion und die wissenschaftliche Betreuung, sowie für die Unterstützung und Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Bartsch bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die fachlichen Diskussionen.

Herrn Professor Steinert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann danke ich ganz besonders für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre hilfreiche Unterstützung und für das freundschaftliche Verhältnis. Der ganzen Arbeitsgruppe möchte ich für das äußerst produktive und angenehme Arbeitsklima sowie für das freundschaftliche Verhalten danken.

Bei Dominik Hinz, Philip Rosenstock und Xenia Wezler möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und für die Unterstützung bei den Experimenten bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihr Vertrauen, Interesse und liebevolle Unterstützung. Insbesondere danke ich meinen lieben Eltern, die mir auch im dichtesten Nebel zeigten den „Kurs“ zu halten.

Zum Schluss möchte ich mich bei Mayken Säuberlich bedanken, deren kleinen Schultern mir jeden Abend die Last der Arbeit abnahmen, damit ich nächsten Tag unbeschwert von neuem beginnen konnte. Danke.

A.1 Bestimmung der *splicing*-Akzeptorsites und -Donossites vom *crfl*-Gen

***** NetAspGene v. 1.0 *****

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAspGene/>

The sequence:Sequence has the following composition:

crfl/accession no. AFUA_1G16190

Length: 1302 nucleotides.

20.0% A, 34.1% C, 25.1% G, 20.7% T, 0.0% X, 59.2% G+C

Donor splice sites, direct strand

	pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron
3'							
	89	0	+	0.00			
CCCCCTTGAGA^GTGAGTGTTT							
	398	2	+	0.41			
TCGTCCCTGGA^GTCGGATGAT							
	426	0	+	0.93			
GGTTGACTGG^GTAAGCCTGC							

Donor splice sites, complement strand

	pos 3'→5'	pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron
3'								
	633	670	1	-	0.45			
AATAGACCAG^GTAACGGCAT								
	604	699	0	-	0.72			
AGTCGATGGT^GTAGGTGTGG								
	565	738	0	-	0.97			
CAACGGGCAC^GTAAGTGCCT H								
	540	763	1	-	0.85			
ATATGTGGTG^GTGTCTCCTT								
	523	780	0	-	0.74			
CTTTGCCAAA^GTAGTTTGTC								
	304	999	1	-	0.86			
GGTGTC AATG^GTAGGTGCGT								
	261	1042	2	-	0.41			
TCGGCGCCCT^GTGGGCCAAC								
	235	1068	1	-	0.63			
TTTGCTGCA^GTGACTTCCC								
	188	1115	2	-	0.91			
AGTCGGCGGT^GTAAGTGGAT								
	104	1199	2	-	0.00			
TCATATGTCG^GTATGAAAAC								

Acceptor splice sites, direct strand

	pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon
3'							
	147	1	+	0.00			
TGTTTTGCAG^AGACCTGCCC							
	167	0	+	0.93			
GCCCAACAAG^GGTCTTGCTG							
	207	1	+	0.68			
TTACCTCAG^CTTCAGCTTT							
	476	1	+	0.46			
TTAACGAAAG^CGCAGGAAGT							
	481	0	+	0.56			
GAAAGCGCAG^GAAGTATTGG							
	485	1	+	0.50			

GCGCAGGAAG^TATTGGGCGG
 508 0 + 0.65
 CACCACTCAG^GTTTCAGACAA

Acceptor splice sites, complement strand

```
-----
pos 3'->5'  pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      intron exon
3'
   466      837      2      -      0.71
TTTCGTTAAG^TCCGGCTCAA
   455      848      1      -      0.86
CCGGCTCAAG^ACGAACACAT
   440      863      1      -      0.93
CACATGATAG^ACAAGCAGGC
   435      868      0      -      0.91
GATAGACAAG^CAGGCTTACC
   432      871      0      -      0.91
AGACAAGCAG^GCTTACCCAG
   408      895      0      -      0.84
CCTCATCCAG^ATCATCCGAC
   393      910      0      -      0.72
CCGACTCCAG^GACGATGCTG
-----
```

CUTOFF values used for confidence:

Highly confident donor sites (H): 95.0 %
 Nearly all true donor sites: 50.0 %

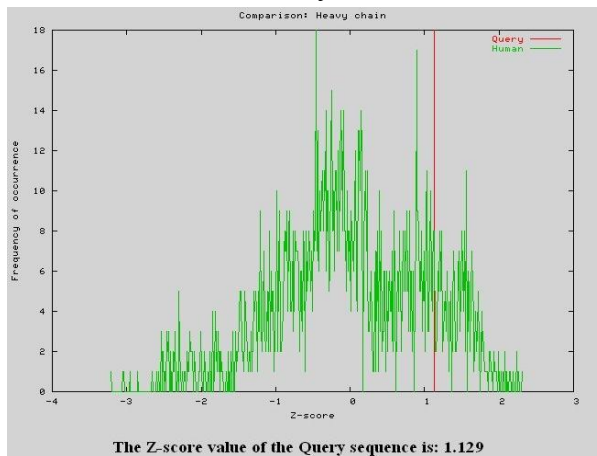
Highly confident acceptor sites (H): 95.0 %
 Nearly all true acceptor sites: 30.0 %

A.2 Titer der IgG-Antikörper aus der aktiven Immunisierung mit rekombinantem Crf2-Protein

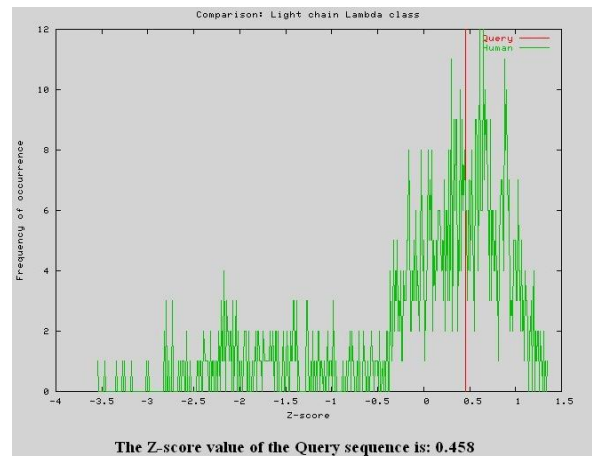
Gruppe1	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus7	Maus 8	Maus 9	Maus 10
Vor Immunisierung	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000	1:256000
Nach Immunisierung	1:256000	1:256000	†	†	1:256000	1:256000	†	†	1:256000	1:256000
Gruppe 2	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus7	Maus 8	Maus 9	Maus 10
Vor Immunisierung	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000
Nach Immunisierung	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	<1:4000	1:256000

†: Mäuse während der intranasalen Infektion unter der Narkose gestorben.

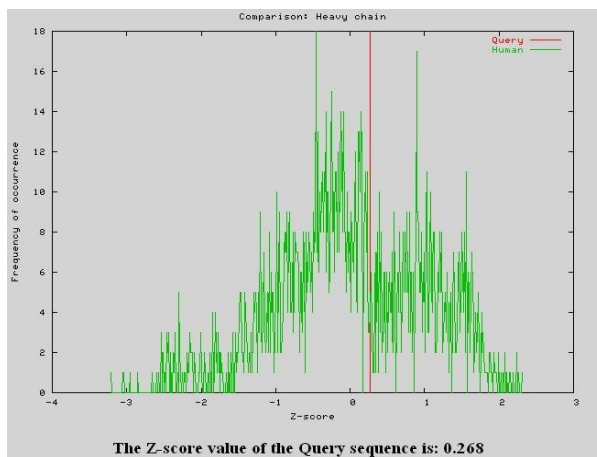
A.3 Humanness-Analysen



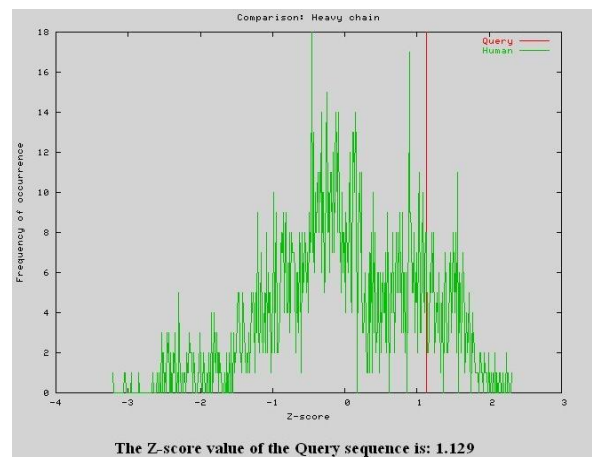
DoH12.2-IIID10 VH



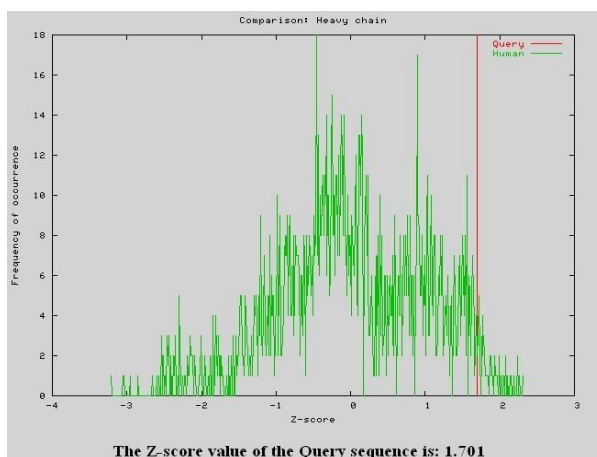
DoH12.2-IIID10 VL



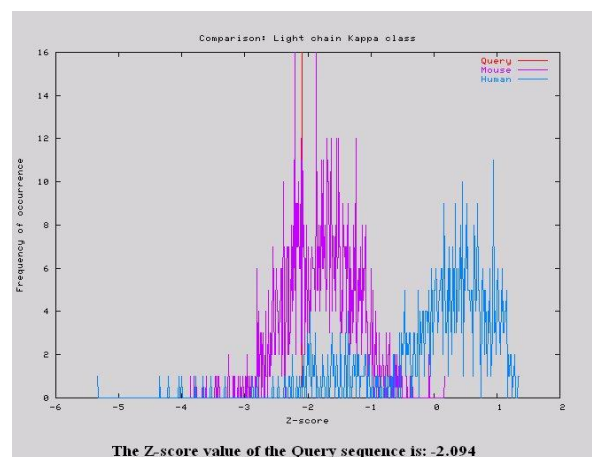
DoH12.2-IIID11 VH



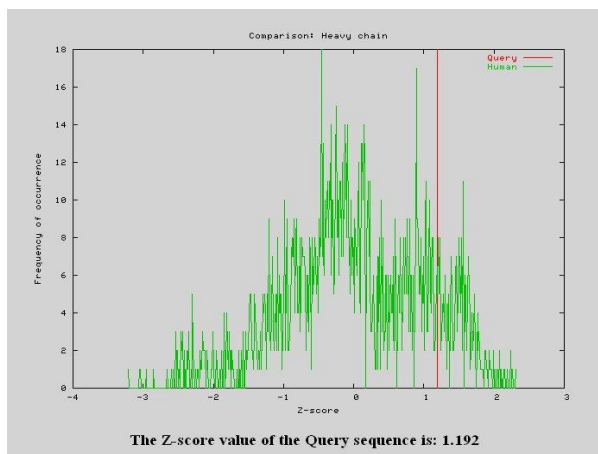
DoH12.2-IIID11 VL



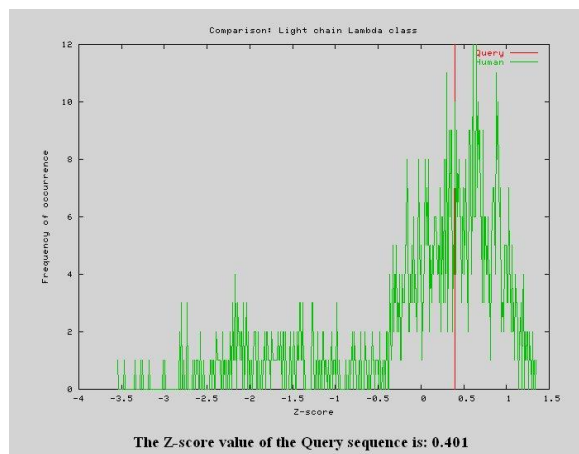
DoH12.2-IIIA11 VH



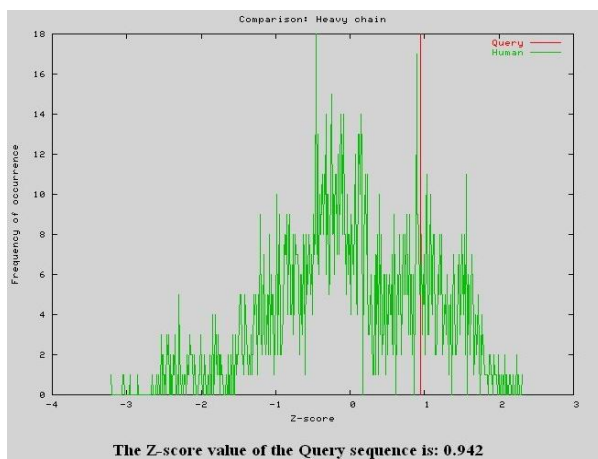
DoH12.2-IIIA11 VL



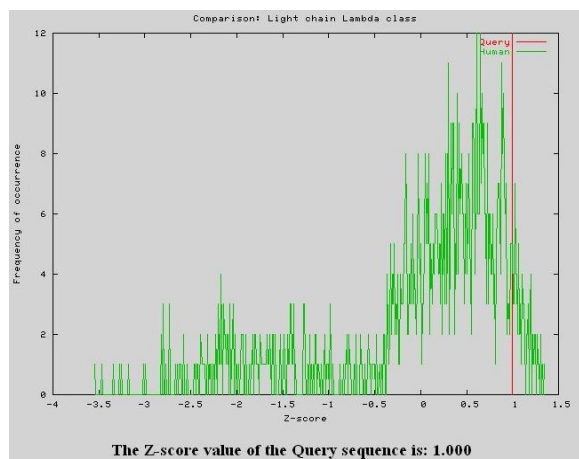
DoH12.2-IIIB8 VH



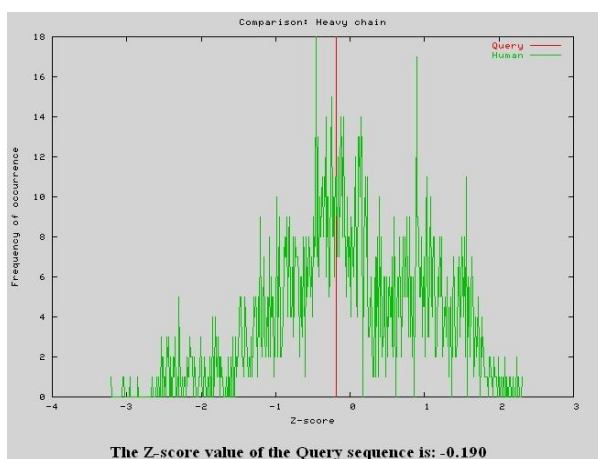
DoH12.2-IIIB8 VL



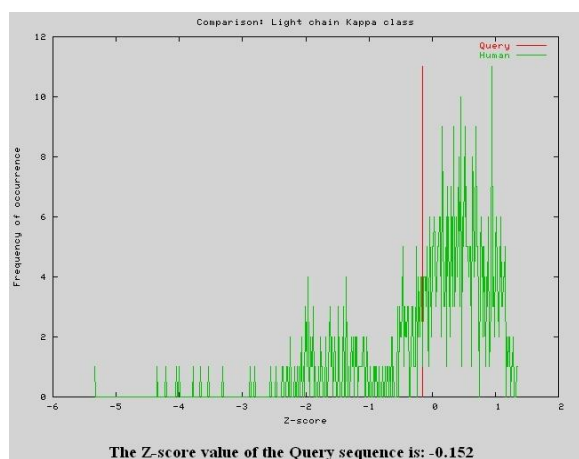
DoH12.2-IIIE11 VH



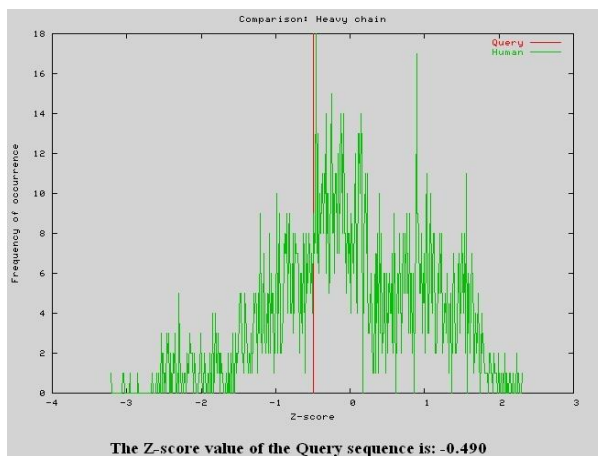
DoH12.2-IIIE11 VL



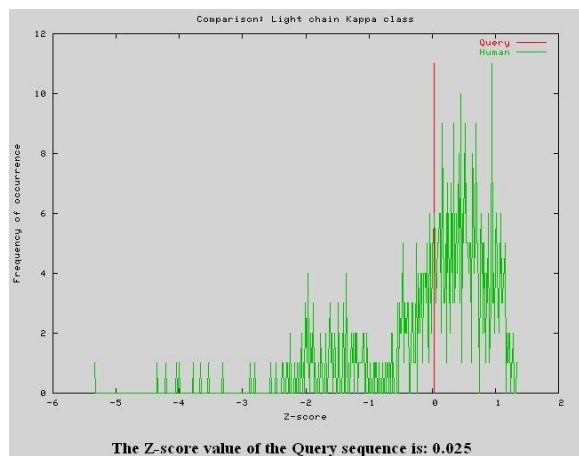
MS112-IIA1 VL



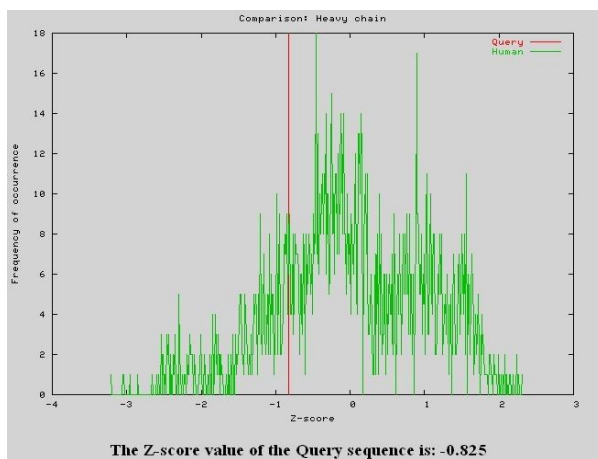
MS112-IIA1 VL



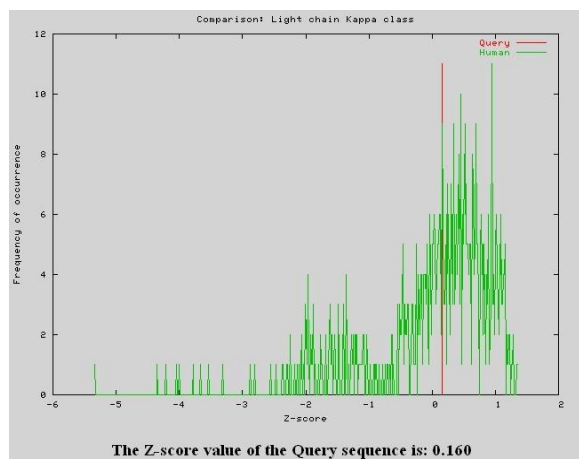
MS112-IIB1 VH



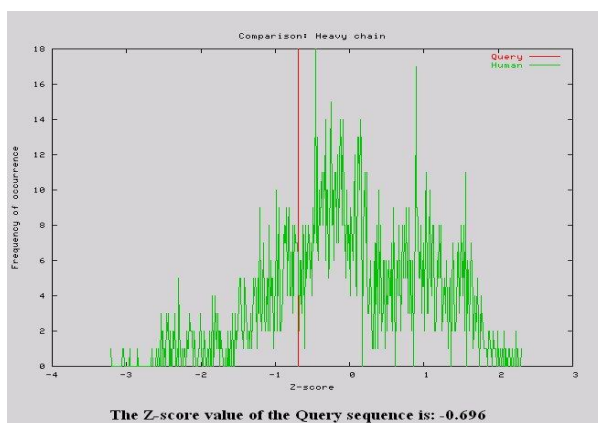
MS112-IIB1 VL



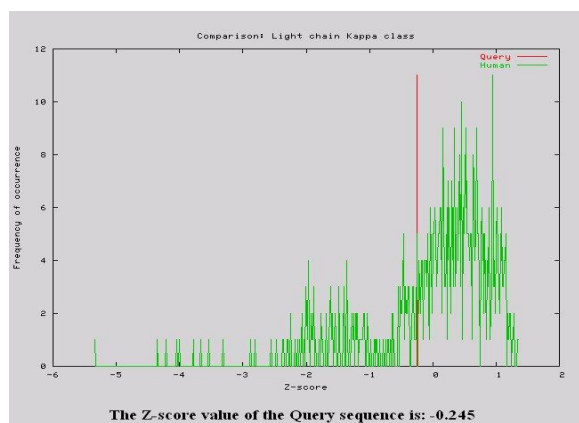
MS112-IB10 VH



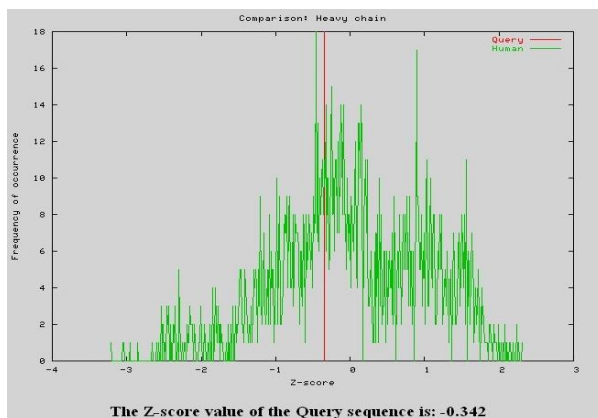
MS112-IB10 VL



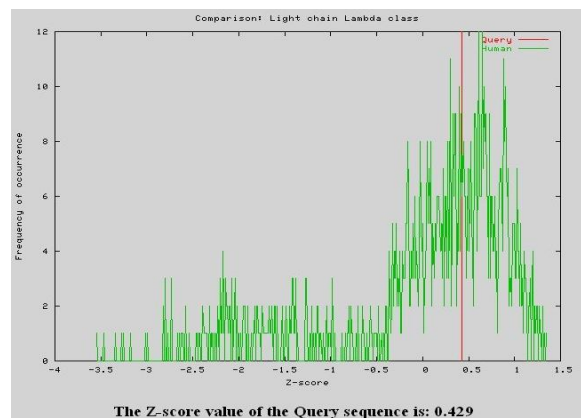
MS112-IIF5 VH



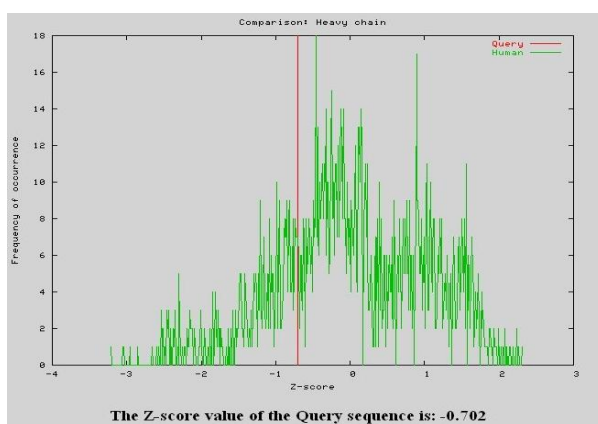
MS112-IIF5 VL



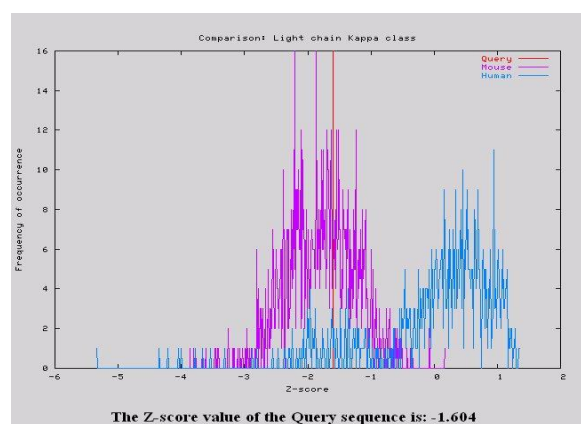
MS130i-IIIC2 VH



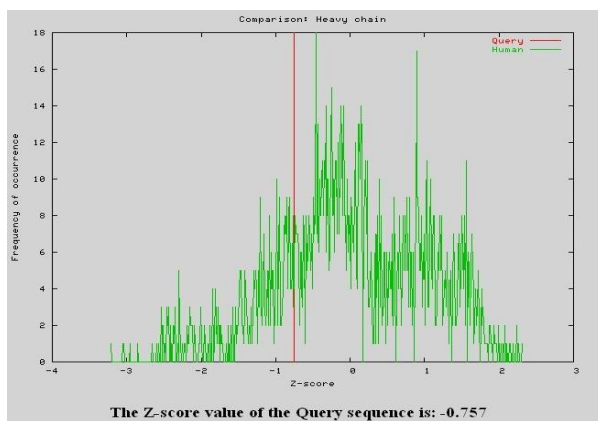
MS130i-IIIC2 VL



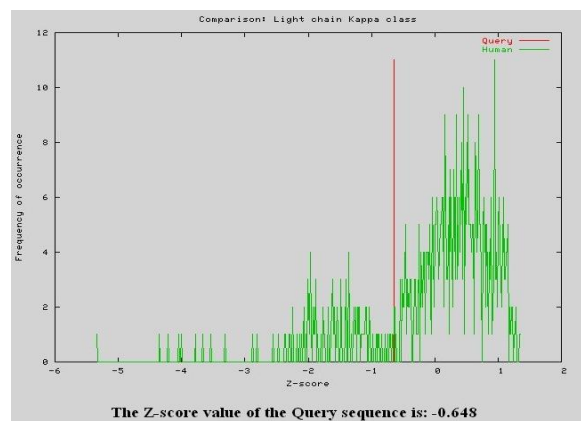
MS130h-IIIC3 VH



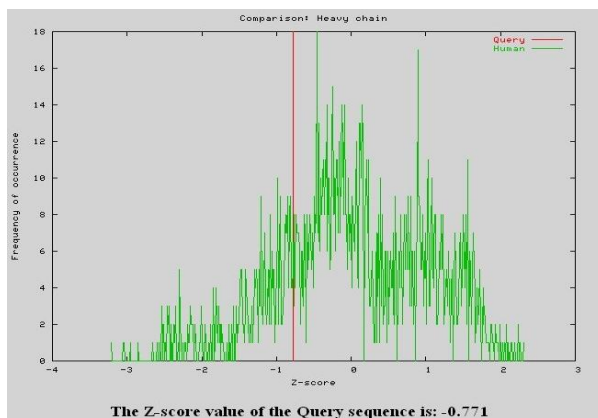
MS130h-IIIC3 VL



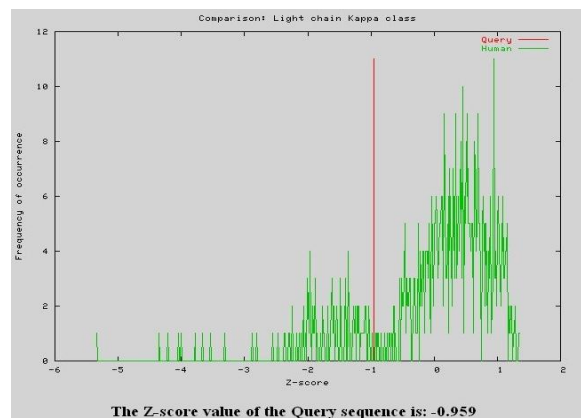
MS130h-IIIG3 VH



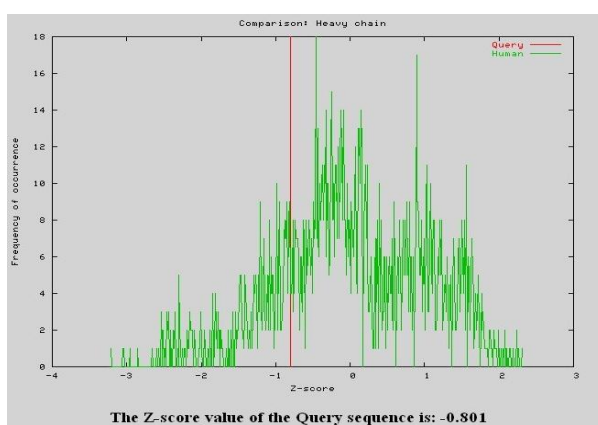
MS130h-IIIG3 VL



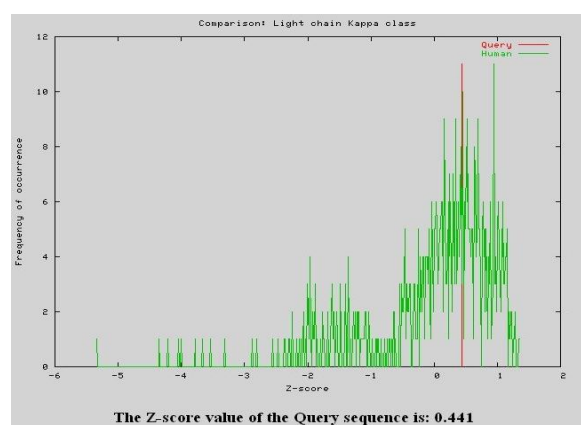
MS130h-IID7 VH



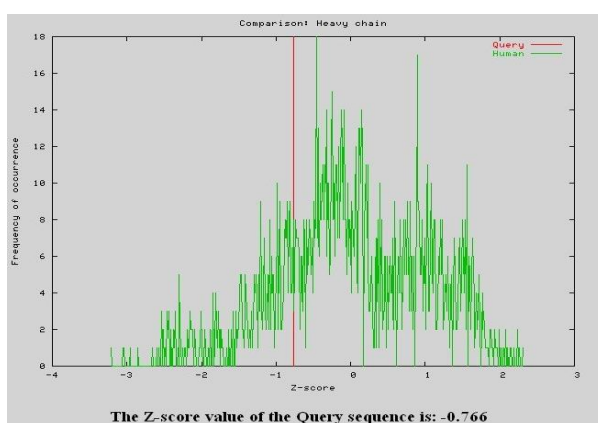
MS130h-IID7 VL



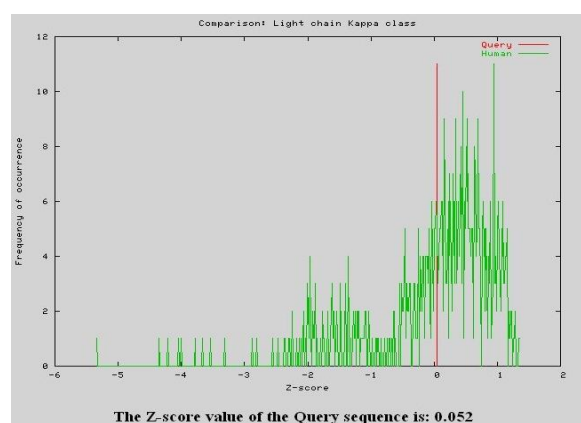
MS130h-IIB6 VH



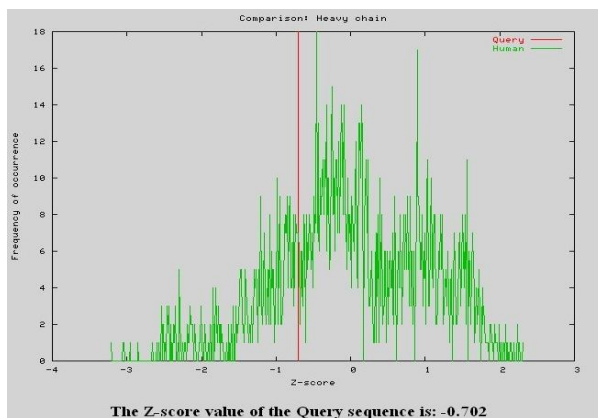
MS130h-IIB6 VL



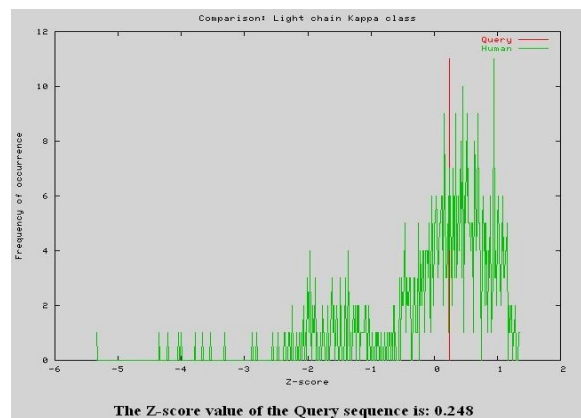
MS130h-IIF4 VH



MS130h-IIF4 VL



MS130h-IIF6 VH



MS130h-IIF6 VL

A.4 Monoklonaler-ELISA

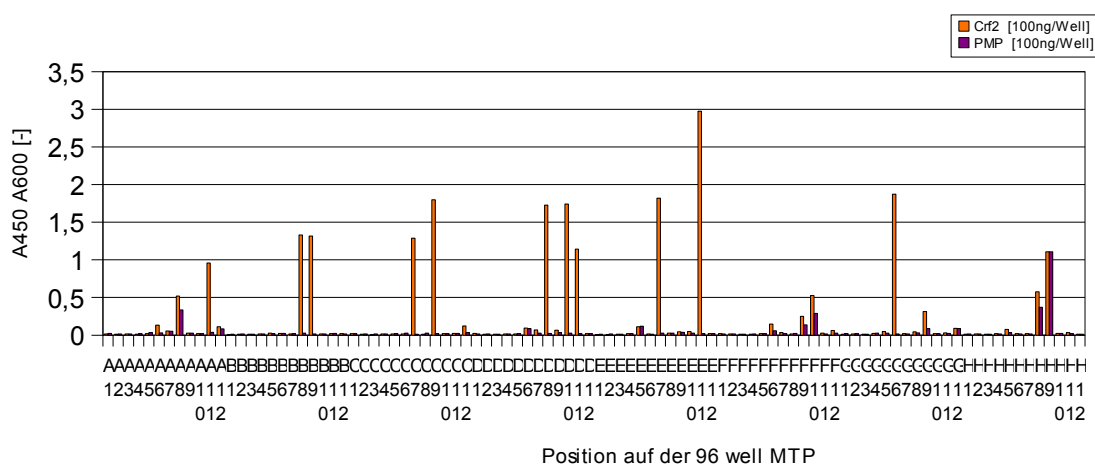


Abbildung 1: Monoklonaler ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörperselektion A1

Für den monoklonalen-ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörpergenbibliothek HAL 4/7 und der Antikörperselektion mit direkt immobilisierten Crf2-Protein wurden in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte 100 ng Crf2-Protein bzw. als Negativkontrolle 100 ng Peroxisomales Membranprotein (PMP) immobilisiert. Nach der Produktion von löslichen scFvs der Einzelklone wurden 50 µL des Kulturüberstands mit 50 µL Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über einen Maus-anti-c-myc-IgG 9E10 Antikörper (1:1.000) und einem Ziege-anti-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

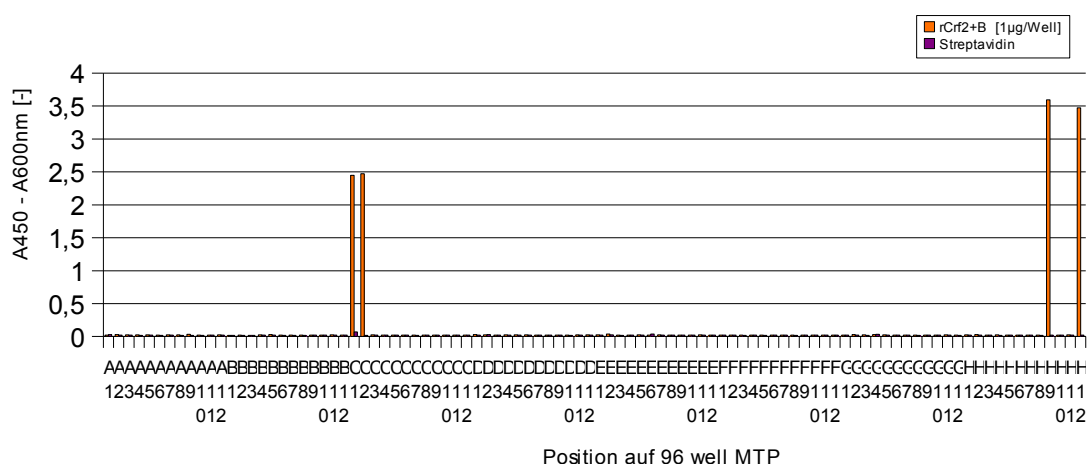
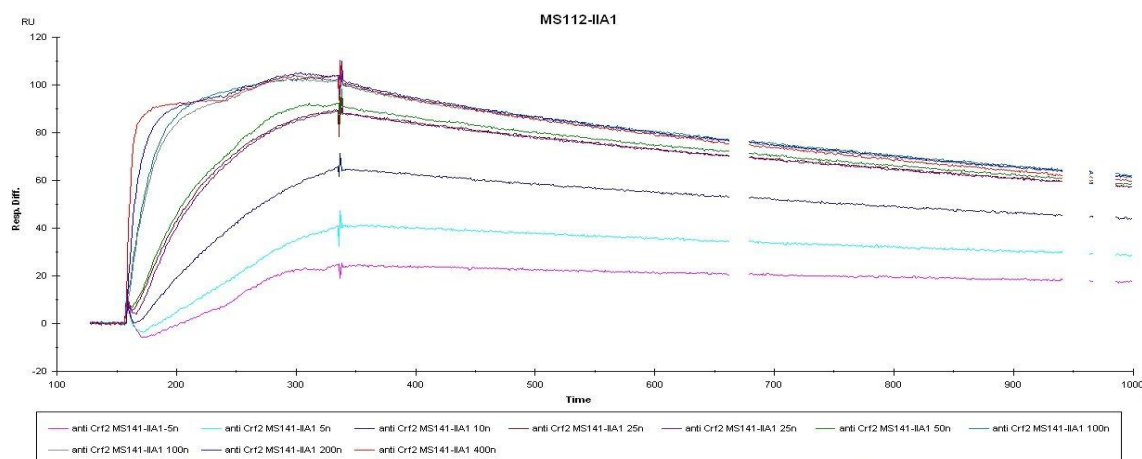


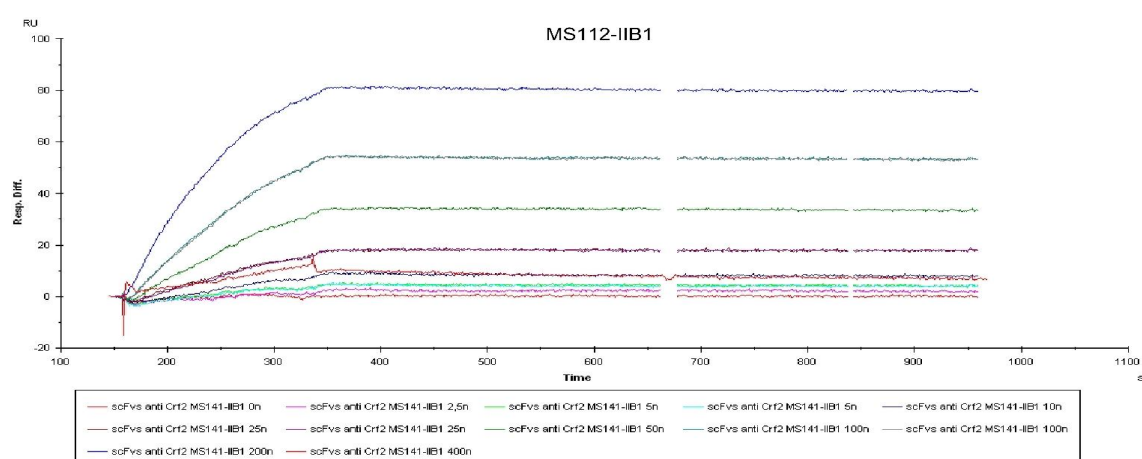
Abbildung 2: Monoklonaler ELISA mit löslichen scFvs aus der Antikörperselektion A2

Für den monoklonalen-ELISA mit den löslichen scFvs aus der Antikörpergenbibliothek MAYKI und der Antikörperselektion in Lösung wurde zuvor in jeder Vertiefung der Streptavidin-Mikrotiterplatten 100 ng *in vivo* biotinyliertes Antigen immobilisiert. Als Negativkontrolle diente Streptavidin ohne biotinyliertes Protein. Nach der Produktion von löslichen scFvs der Einzelklone wurden 50 µL des Kulturüberstands mit 50 µL Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über einen Maus-anti-c-myc-IgG 9E10 Antikörper (1:1.000) und einem Ziege-anti-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

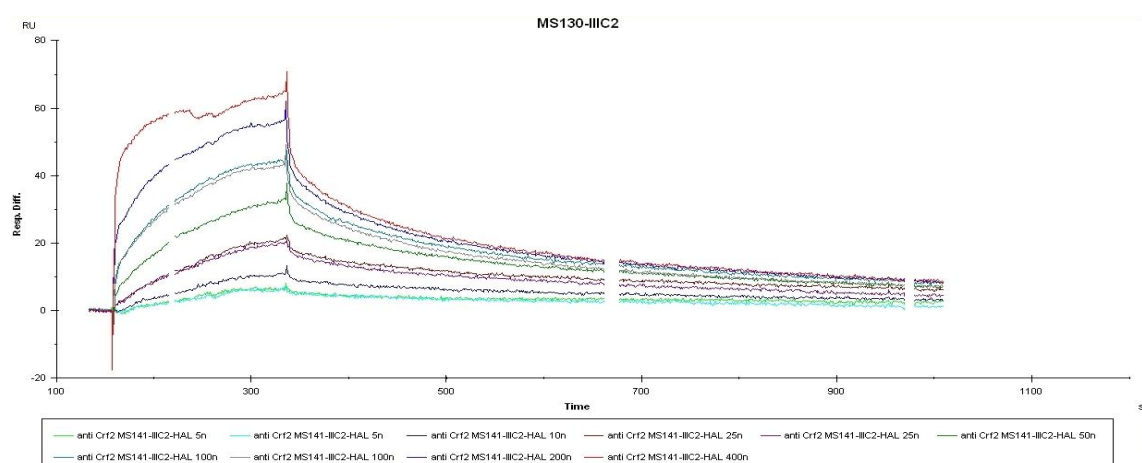
A.5 SPR-Analysen zur Affinitätsbestimmung - Sensorgramme



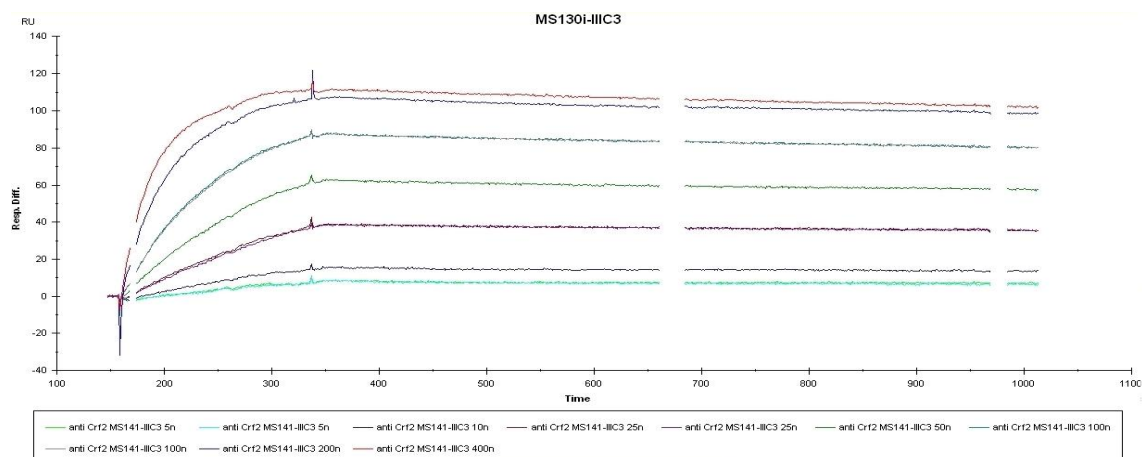
A) scFv MS112-IIA1 anti-Crf2



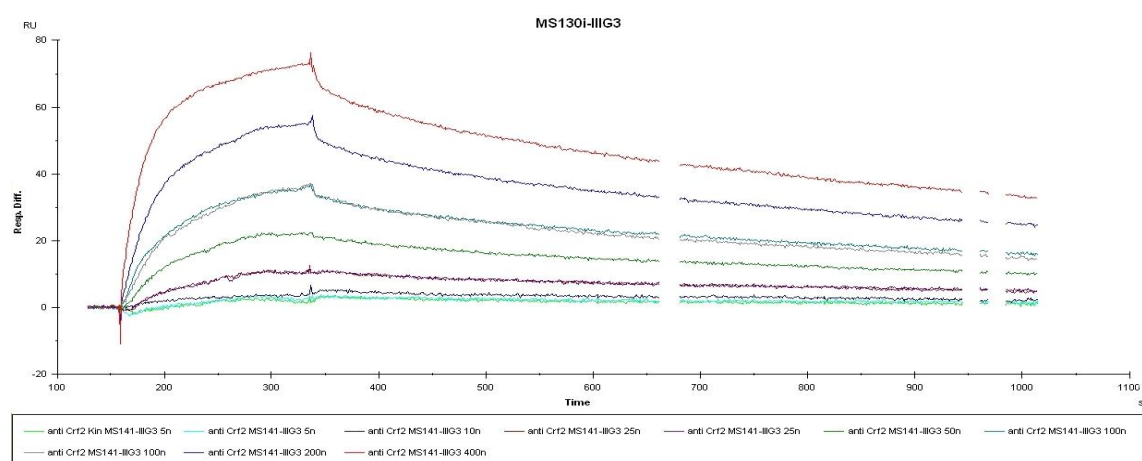
B) scFv MS112-IIB1 anti-Crf2



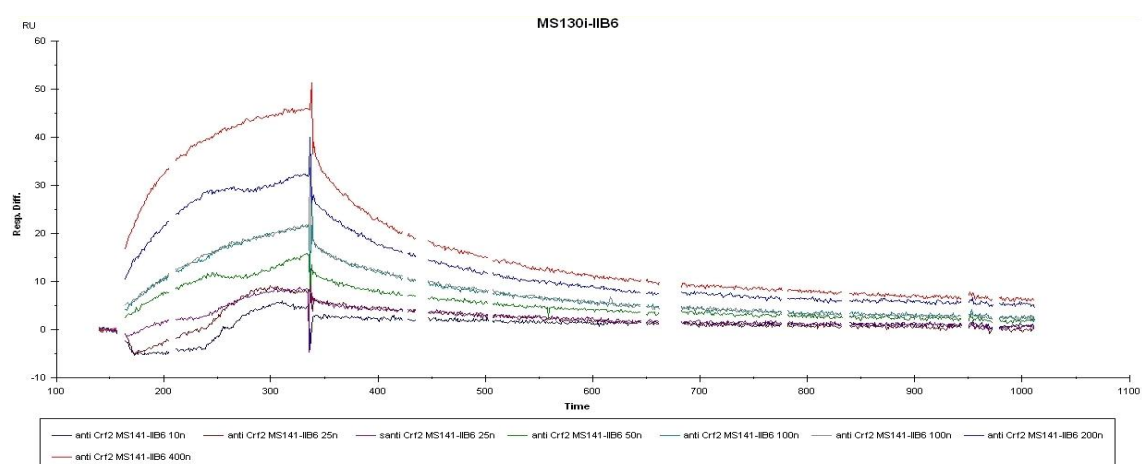
C) scFv MS130-IIIC2 anti-Crf2



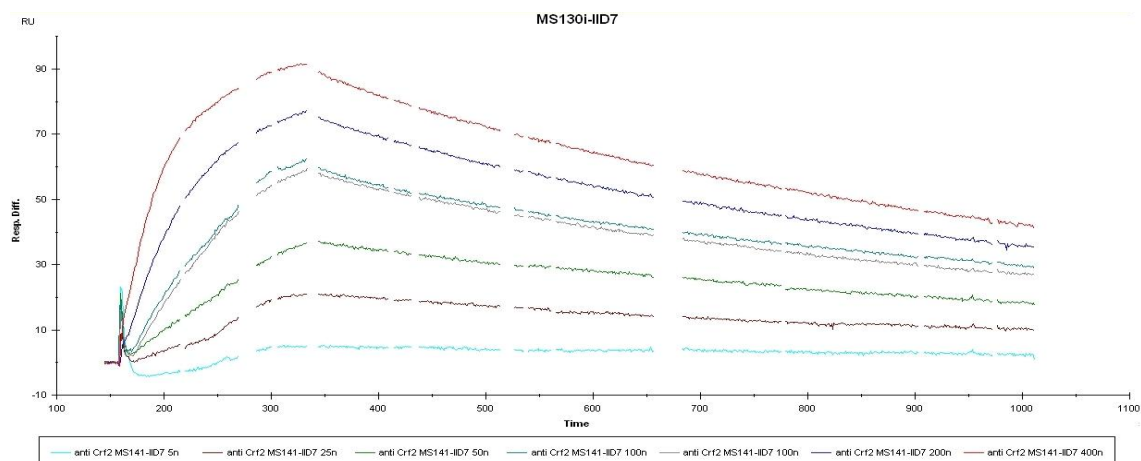
D) scFv MS130i-IIIC3 anti-Crf2



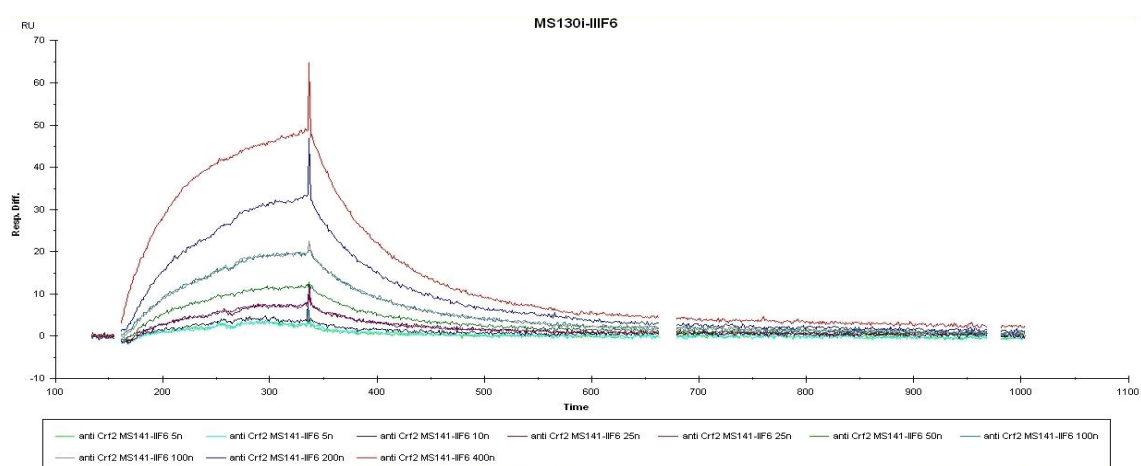
E) scFv MS130i-IIIG3 anti-Crf2



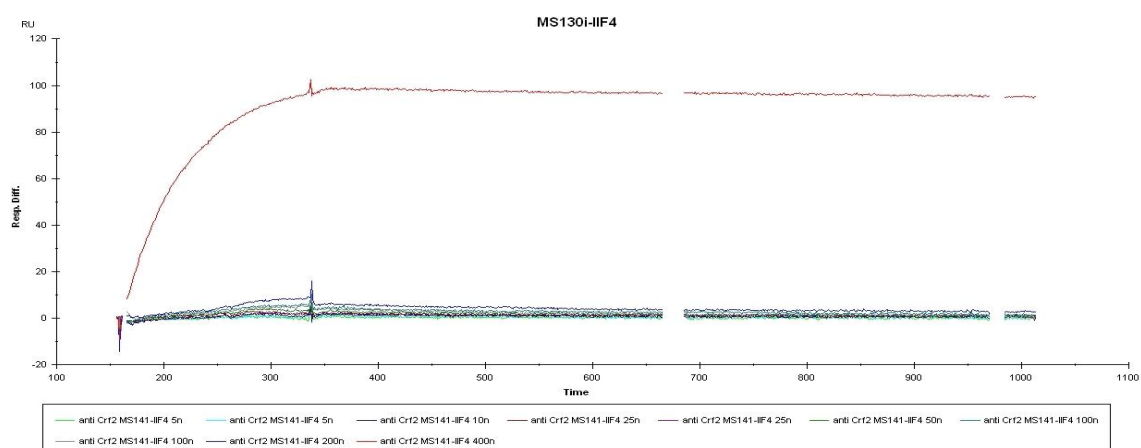
F) scFv MS130i-IIB6 anti-Crf2



G) scFv MS130i-IID7 anti-Crf2



H) scFv MS130i-IIF6 anti-Crf2



I) scFv MS130i-IIF4 anti-Crf2